

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**ESTUDIO DE LA HIRSUTELINA COMO NUEVO
MIEMBRO DE LA FAMILIA DE LAS RIBOTOXINAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Elías Herrero Galán

Bajo la dirección de la doctora
Mercedes Oñaderra Sánchez

Madrid, 2008

• **ISBN: 978-84-692-1076-5**

© Elías Herrero Galán, 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**ESTUDIO DE LA HIRSUTELINA COMO UN NUEVO
MIEMBRO DE LA FAMILIA DE LAS RIBOTOXINAS**

TESIS DOCTORAL

ELÍAS HERRERO GALÁN

Madrid, 2008

ÍNDICE

Abreviaturas, siglas y símbolos	5
Introducción	7
La familia de la barnasa	10
La familia de la ribonucleasa T1	14
La ribonucleasa U2	17
La familia de las ribotoxinas	20
La α -sarcina	29
La hipótesis del intermedio evolutivo	33
El hongo <i>Hirsutella thompsonii</i>	34
La hirsutelina como posible intermedio evolutivo	36
Objetivos	39
Materiales y Métodos	43
Materiales	45
Microorganismos	45
Medios de cultivo	47
Oligonucleótidos	48
Vectores plasmídicos	51
Lípidos y sondas fluorescentes	51
Tampones y soluciones de uso general	52
Métodos	54
Conservación de cepas	54
Manipulación de cepas de <i>E. coli</i>	54
Manipulación de DNA	56
Producción y purificación de proteínas	61
Caracterización estructural de las proteínas obtenidas	63
Ensayos de actividad ribonucleolítica	70
Ensayos de interacción con lípidos	74
Ensayos con células	77
Resultados	79
Producción y purificación de hirsutelina de <i>Hirsutella thompsonii</i>	81
Producción y purificación de hirsutelina recombinante	83
Caracterización estructural de la hirsutelina	85
Caracterización de la actividad ribonucleolítica	91
Estudios de interacción con fosfolípidos	95
Estudio del efecto de la hirsutelina sobre células eucariotas	101
Obtención y caracterización de mutantes de hirsutelina	105

Discusión	111
Relaciones estructura-función en la familia de las ribotoxinas	114
Evolución y posible función biológica de las ribotoxinas	132
Perspectivas de futuro en la investigación sobre ribotoxinas	135
Conclusiones	137
Referencias	141

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

A	adenina
Amp	ampicilina
A_n	absorbancia a la longitud de onda n (nm)
C	citosa
Ch	colesterol
cDNA	DNA copia, sintetizado utilizando como molde RNA
DAB	2',3'-diaminobencimidina
DEAE	dietilaminoetil
DEPC	dietilpirocarbonato
DMPC	dimiristoilfosfatidilcolina
DMPG	dimiristoilfosfatidilglicerol
DO_n	densidad óptica a la longitud de onda n
DSC	calorimetría diferencial de barrido
E_{cat}	eficacia catalítica
FPLC	cromatografía de líquidos de rápida ejecución
G	guanina
g	en centrifugación, aceleración del campo gravitatorio terrestre
HtA	hirsutina A
IgE	Inmunoglobulina E
IPTG	β -D-tiogalactopiranosido de isopropilo
ITC	calorimetría de titulación isotérmica
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
Ni-NTA	agarosa modificada con ácido nitriloacético y níquel
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PAGE-SDS	electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
pb	par(es) de bases de DNA
PBS	tampón fosfato salino (NaCl 0.14 M, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM, pH 7.4)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PG	fosfatidilglicerol
pI	punto isoeléctrico
PS	fosfatidilserina
p/v	proporción peso/volumen
RNasa, RNasas	ribonucleasa(s)
RIPs	proteínas inhibidoras de ribosomas
RMN	resonancia magnética nuclear
rpm	revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosomal
SDS	dodecilsulfato sódico
SRL	bucle sarcina/ricina, en el RNA ribosomal 28S
ssDNA	DNA de cadena simple
T	timina
T.A.	temperatura ambiente

TAE	tampón Tris-acetato-EDTA (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 1 mM, pH 8.0)
TE	tampón Tris-EDTA (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4 - 8.0)
T _m	Temperatura de desnaturalización
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
tRNA	RNA de transferencia
U	uracilo
UV	ultravioleta
v/v	proporción volumen/volumen
λ	longitud de onda

INTRODUCCIÓN

Se conoce con el nombre de ribonucleasas (RNasas) a los miembros de una amplia familia de enzimas capaces de romper enlaces fosfodiéster entre ribonucleótidos. Se encuentran en todos los organismos vivos y son esenciales para el correcto procesamiento de las diversas formas del ácido ribonucleico (RNA), además de participar en procesos de degradación inespecífica. La mayoría de las RNasas son enzimas proteicas, con una gran diversidad estructural, pero también existen ejemplos bien caracterizados en los que el núcleo de la catálisis es una molécula de RNA. Por tanto, las RNasas se muestran como una de las familias de enzimas que aún mantienen conexión con el presunto mundo RNA primigenio (Gopalan y Altman, 2000; Ke y Doudna, 2006), lo que les dota de un interés adicional en cuanto al estudio de su evolución se refiere.

Existen multitud de plegamientos diferentes con actividad ribonucleolítica evolucionada de modo independiente, pero la mayoría de las RNasas, como sucede de modo general con las enzimas, derivan más frecuentemente de las clases α/β y $\alpha+\beta$ de proteínas. Este tipo de estructuras combina la flexibilidad de las hélices α con la rigidez de las hebras β , lo que las convierte en buenos soportes para actividades catalíticas. También es típico en la mayoría de las familias de RNasas que se produzca fusión del centro catalítico con varios dominios de unión a RNA y, menos frecuentemente, con otras enzimas del metabolismo de los ácidos nucleicos, como las helicasas (Aravind y Koonin, 2001).

Dentro del grupo de las RNasas $\alpha+\beta$ se encuentran clasificadas las ribonucleasas extracelulares, reducidas en número pero de gran interés por los numerosos estudios realizados sobre su potencial aplicación biomédica, especialmente contra diversos tipos de cáncer (Rathore y Batra, 1997; Leland y Raines, 2001; Matousek, 2001). La función biológica de estas RNasas se desconoce, aunque parecen estar involucradas en degradación de RNA exógeno como fuente de bases nitrogenadas y fosfato (MacIntosh *et al.*, 2001; Deshpande y Shankar, 2002). También se ha sugerido a este respecto en algunos casos su implicación en mecanismos de defensa del organismo productor (Brandhorst *et al.*, 1996; Rosenberg y Domachowske, 1999).

A pesar de constituir una población minoritaria, las RNasas extracelulares se dividen a su vez en tres superfamilias considerablemente diferentes entre sí: las que engloban, respectivamente, proteínas de plegamiento homólogo a la barnasa (RNasa de *Bacillus amyloliquefaciens*), la RNasa A (pancreática bovina) y la RNasa T2 (de *Aspergillus oryzae*), de las que reciben el nombre por tratarse de los miembros principales de cada una de ellas (Aravind y Koonin, 2001). La primera de estas tres superfamilias, la de la barnasa, incluye a las ribonucleasas extracelulares fúngicas de las que trata en sentido amplio el presente trabajo.

La superfamilia de la barnasa

Esta superfamilia engloba RNasas extracelulares microbianas formadas por una única cadena polipeptídica con un núcleo central constituido por una lámina β antiparalela de cuatro hebras y un centro activo en el que participa la tríada catalítica E-R-H (Figuras 1, 2 y 3). Poseen una distribución muy restringida, característica de proteínas secretadas, lo que sugiere que han aparecido recientemente en la evolución, probablemente como adaptación para la utilización de polirribonucleótidos ambientales. Dentro de esta superfamilia se puede distinguir entre las RNasas extracelulares de origen bacteriano, que se agrupan bajo el nombre de familia barnasa propiamente dicha, y las de origen fúngico, repartidas entre las familias de la RNasa T1 y de las ribotoxinas (Tabla I).

Familia	Origen	Ejemplos	Número de aminoácidos
Barnasa	Bacterias	Barnasa	110
RNasa T1	Hongos	T1	104
		U2	114
Ribotoxinas	Hongos	Restrictocina	149
		α -sarcina	150

Tabla I: La superfamilia de la barnasa. Barnasa, de *Bacillus amyloliquefaciens*; T1, de *Aspergillus oryzae*; U2, de *Ustilago sphaerogena*; α -sarcina, de *Aspergillus giganteus*.

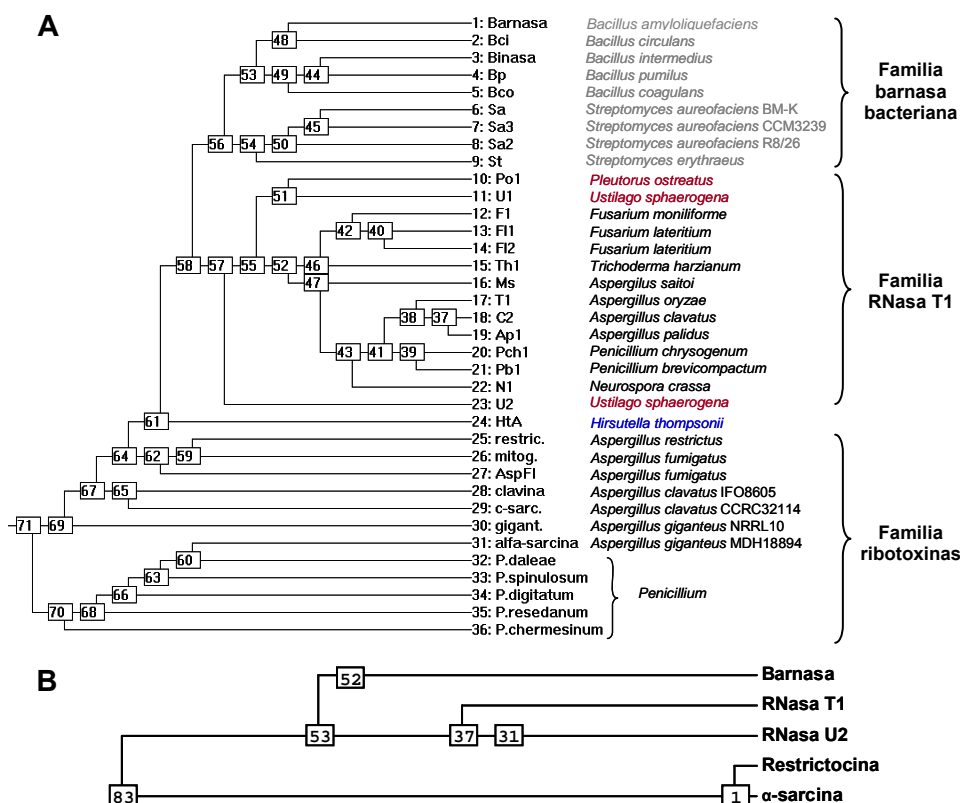


Figura 1: Árbol filogenético de la superfamilia de la barnasa. A: Se indican a la derecha los organismos productores: en gris, procariotas; en negro, hongos ascomicetos; en rojo, hongos basidiomicetos; en azul, el hongo ascomiceto productor de la hirsutelina A (HtA). Los números indican las distancias filogenéticas (Martínez-Ruiz, 2000; García-Ortega, 2004). **B:** Árbol simplificado para los principales representantes de cada una de las familias.

Los principales microorganismos productores de RNasas extracelulares de la familia de la barnasa bacteriana pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*, mientras que los hongos ascomicetos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* son los más representados en el conjunto de productores de ribotoxinas y RNasas de la familia T1. Es digna de destacar la excepción constituida por el hongo basidiomiceto *Ustilago sphaerogena*, productor de la RNasa U2 (Figura 1). Comparando de modo general las secuencias de aminoácidos se observan claras diferencias entre las RNasas de origen procariota y eucariota, pero un análisis más pormenorizado demuestra que las RNasas secretadas por el género *Streptomyces* presentan mayor homología con las de la familia T1 que con el resto de RNasas bacterianas. Esta similitud incluye el patrón de formación de puentes disulfuro y hace que puedan ser consideradas un grupo evolutivo intermedio entre ambas familias.

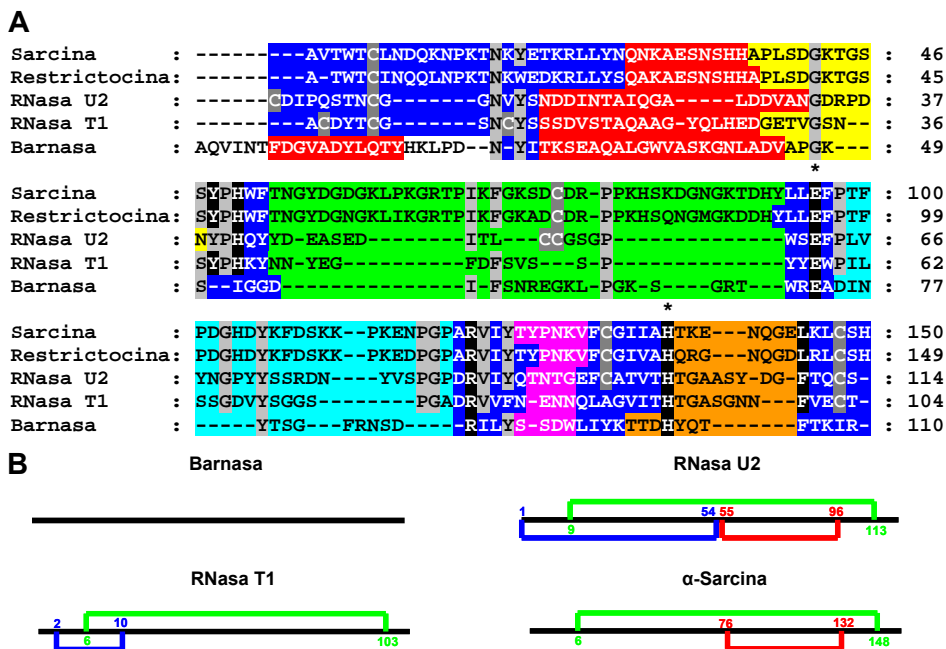


Figura 2: A: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los principales miembros de la superfamilia de la barnasa. En negro, los residuos con implicación conocida en el centro activo (con asterisco, los residuos esenciales para la funcionalidad del mismo); en gris oscuro, las cisteínas implicadas en la formación de puentes disulfuro; en gris claro, residuos conservados en al menos cuatro de las cinco secuencias. Los colores delimitan fragmentos de estructura secundaria (azul, lámina β ; rojo, hélice α ; amarillo, verde, celeste, magenta y naranja, bucles 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente). El código de colores coincide con el de las estructuras de la *Figura 3*. (-) indica ausencia de aminoácido. **B: Patrón de puentes disulfuro.** El mismo color indica equivalencia del enlace en las distintas secuencias.

De modo similar, cuando se comparan las RNasas de la familia T1 y las ribotoxinas se encuentran homologías de secuencia de hasta un 25% (Sacco *et al.*, 1983), acompañadas de un alto grado de similitud estructural, así como de la conservación del centro activo responsable de la actividad fosfodiesterasa de estas enzimas (Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000) (*Figuras 2 y 3*). Sin embargo, las ribotoxinas presentan una serie de características únicas que las alejan del resto de miembros de la superfamilia, sobre todo en lo que se refiere a su función: poseen unos 40 aminoácidos más en su secuencia, son básicas, y exhiben una alta especificidad por su sustrato natural, el RNA ribosomal, además de resultar citotóxicas gracias a su capacidad de interaccionar con membranas (Wool, 1997). Estructuralmente, las principales diferencias entre las ribotoxinas y las RNasas de la familia T1 radican en la longitud y ordenamiento de los bucles de estructura aperiódica y en el tamaño de la horquilla β del extremo aminoterminal, elementos en los que se cree que residen las funciones añadidas a las primeras respecto a las segundas. Consecuentemente, el estudio comparativo

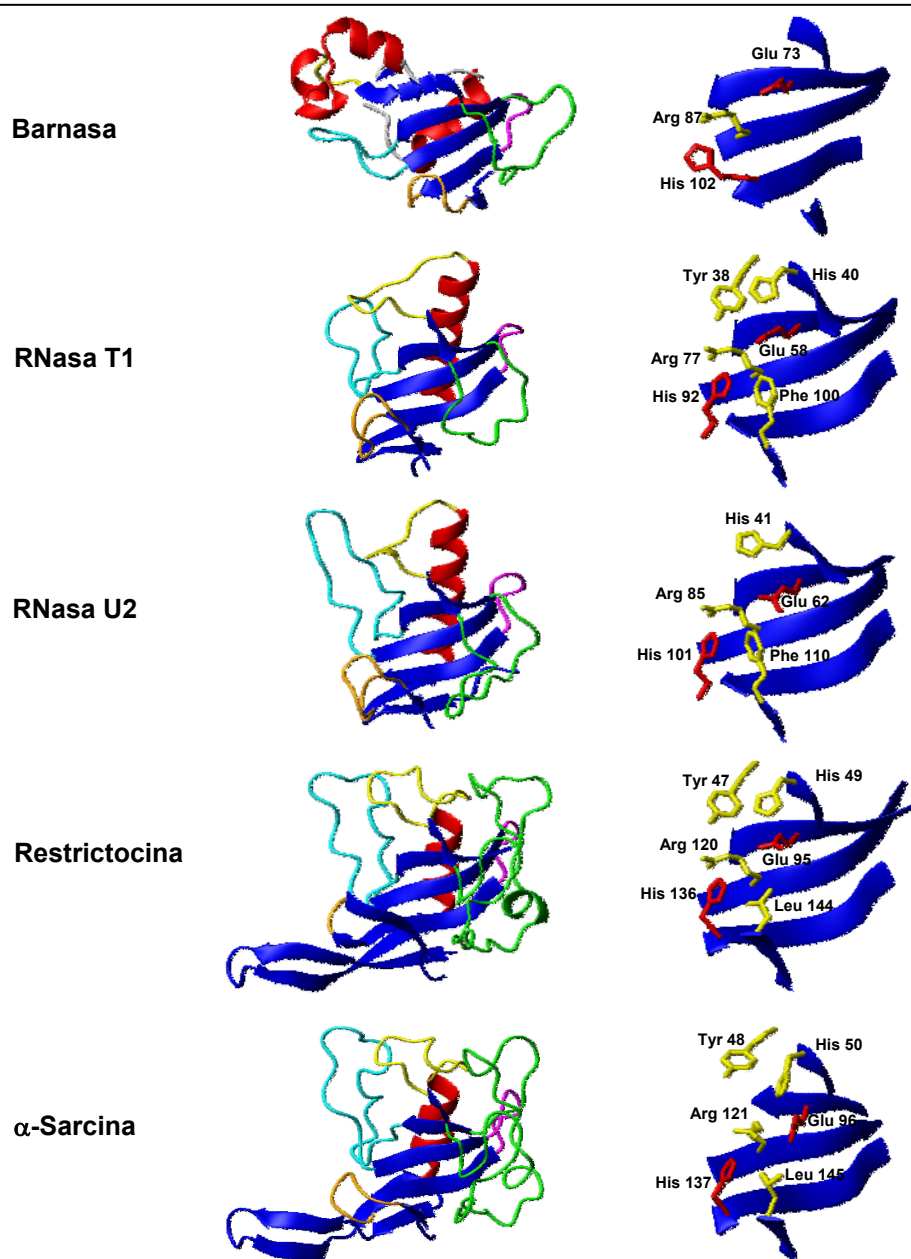


Figura 3: Estructuras tridimensionales de los principales miembros de la superfamilia de la barnasa. El código de colores coincide con el de las secuencias de la *Figura 2*. A la derecha, detalle de los centros activos. Se destacan en rojo los residuos esenciales para la funcionalidad de la proteína; en amarillo, otros residuos con implicación conocida en el mecanismo catalítico. Diagramas generados con el programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996) a partir de las coordenadas depositadas en el PDB: barnasa, 1A2P (Mauguen *et al.*, 1982); RNasa T1, 9RNT (Martínez-Oyanedel *et al.*, 1991); RNasa U2, 1RTU (Noguchi *et al.*, 1995); restrictocina, 1AQZ (Yang y Moffat, 1996); α -sarcina, 1DE3 (Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000).

entre estas dos familias resulta de particular interés, por cuanto podría contribuir a la identificación de los elementos estructurales que determinan la actividad citotóxica de las ribotoxinas y su función biológica.

La familia de la ribonucleasa T1

Las RNasas de la familia T1 son proteínas extracelulares no tóxicas secretadas por hongos, principalmente del género *Aspergillus* (Figura 1). Su miembro más representativo, la RNasa T1, es una de las enzimas más exhaustivamente caracterizadas de cuantas se conocen hasta la fecha, tanto desde un punto de vista estructural como funcional (Steyaert, 1997). Gracias en gran medida a la obtención de estructuras de distintos complejos con inhibidores y análogos de sustrato se conoce con gran detalle el mecanismo de la reacción que cataliza, incluyendo el papel de los residuos implicados en la catálisis y reconocimiento del sustrato (Heinemann y Hahn, 1989; Gohda *et al.*, 1994; Zegers *et al.*, 1994, 1998; Steyaert, 1997; Arni *et al.*, 1999; Loverix y Steyaert, 2001). La mayoría de sus características se hacen extensibles al resto de miembros de la familia, bien porque se han comprobado directamente o bien porque se aceptan basándose en la homología de secuencia existente entre ellas.

Características estructurales. Los miembros de la familia T1 son proteínas ácidas de entre 100 y 114 aminoácidos, cuya estructura consta principalmente de una lámina β central antiparalela de cinco hebras, estabilizada por una hélice α que se acopla perpendicularmente a ella en su cara convexa (Arni *et al.*, 1999). La molécula se completa con cinco bucles de estructura aperiódica expuestos al disolvente y otra pequeña lámina β de dos hebras en el extremo aminoterminal (Figura 3). El mismo patrón de plegamiento general es extensible a la familia de las ribotoxinas, a pesar de las diferencias de secuencia (Pace *et al.*, 1991; Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000). Del mismo modo, se conserva entre los distintos miembros de ambas familias el puente disulfuro entre los extremos amino y carboxilo terminales, aunque también se encuentran otros enlaces de este tipo con distribución diversa (hasta un total de tres en algunos casos) que permiten distinguir cinco subfamilias atendiendo a los distintos patrones conservados. El centro activo se localiza en la cara cóncava de la lámina β central y es la zona en la que se detectan menores variaciones entre los distintos miembros de la superfamilia de la barnasa (Figura 3). Las regiones en las que se localizan mayores diferencias, incluso dentro de la propia familia T1, son los bucles periféricos y los extremos amino y carboxilo terminales. En las RNasas de la familia T1 los bucles se encuentran totalmente accesibles al disolvente y es el 5, el más corto, el que más interacciones presenta con el centro catalítico.

Características funcionales. El mecanismo catalítico de las RNasas de la familia T1 transcurre en dos etapas (*Figura 4*). La primera, que es además la etapa determinante de la velocidad de reacción, consta de una transfosforilación reversible que da lugar a un intermedio cíclico 2',3'-ciclofosfato. La segunda supone la hidrólisis de este intermedio con participación de una molécula de agua y es más o menos reversible y rápida según la enzima. Este mecanismo es común para la mayoría de las RNasas (aunque en algunos casos se produce una hidrólisis directa) y se basa en una catálisis ácido-base en línea, en la que se producen desplazamientos nucleófilos de los átomos de oxígeno del grupo fosfato que originan estados de transición en los que el átomo de fósforo está unido de manera pentacovalente al oxígeno. En cambio, el tipo de sustrato (RNA de cadena doble o simple), la especificidad de corte, los residuos catalíticos (tanto esenciales como no esenciales) y las propiedades que definen a la enzima varían según la familia. En el caso de la familia T1, el sustrato que pueden hidrolizar es RNA de cadena simple y presentan especificidad por secuencias 3'-GpN-5', con la excepción de la RNasa U2, que también hidroliza enlaces del tipo 3'-ApN-5' (Egami *et al.*, 1980). En cuanto al pH óptimo para la reacción, ronda valores próximos a la neutralidad en el caso de la T1, pero resulta ser ácido para la U2, de cuyo caso particular se hablará más adelante.

Los residuos catalíticos esenciales de la RNasa T1 son la His 92 y el Glu 58, que participan como ácido y base respectivamente en la primera etapa de reacción e invierten sus papeles en la segunda (*Figura 4*) (Steyaert y Wyns, 1993). Ambos aparecen conservados en toda la superfamilia de la barnasa, mientras que en otros casos, como el de la RNasa A, son dos histidinas en distinto estado de protonación las responsables de la catálisis. De hecho, se ha planteado un mecanismo alternativo para la T1 en el que la His 40 cumpliría la función que se atribuye al Glu 58 (Nishikawa *et al.*, 1987; Steyaert *et al.*, 1990). Sin embargo, la verdadera función de esta histidina en la enzima natural es contribuir a la activación nucleófila y establecer enlaces de hidrógeno con el grupo 2'-OH de la ribosa que participa en el intermedio cíclico, todo en cooperación con el Glu 58, al que se encuentra próxima en la estructura (Gohda *et al.*, 1994). Otro residuo altamente conservado es la Arg 77, que parece participar en la estabilización del estado de transición, aunque su implicación sólo ha sido estudiada en el caso de las ribotoxinas (Heinemann y Saenger, 1982; Masip *et al.*, 2001). Por último, los residuos Tyr 38 y Phe 100 participan en la optimización del grado de solvatación/desolvatación del intermedio cíclico. Este efecto es crítico en este tipo de catálisis, ya que la estructura de bipirámide trigonal monoaniónica que forma el grupo fosfato en la transición aparece gracias a la presencia única de dos especies cargadas. Así, Tyr 38, Arg 77 y Phe 100 conforman un microentorno estructural y dieléctrico complementario con el estado de transición en forma, carga y capacidad de formar enlaces de hidrógeno con los átomos de oxígeno del intermedio cíclico (Loverix y Steyaert, 2001).

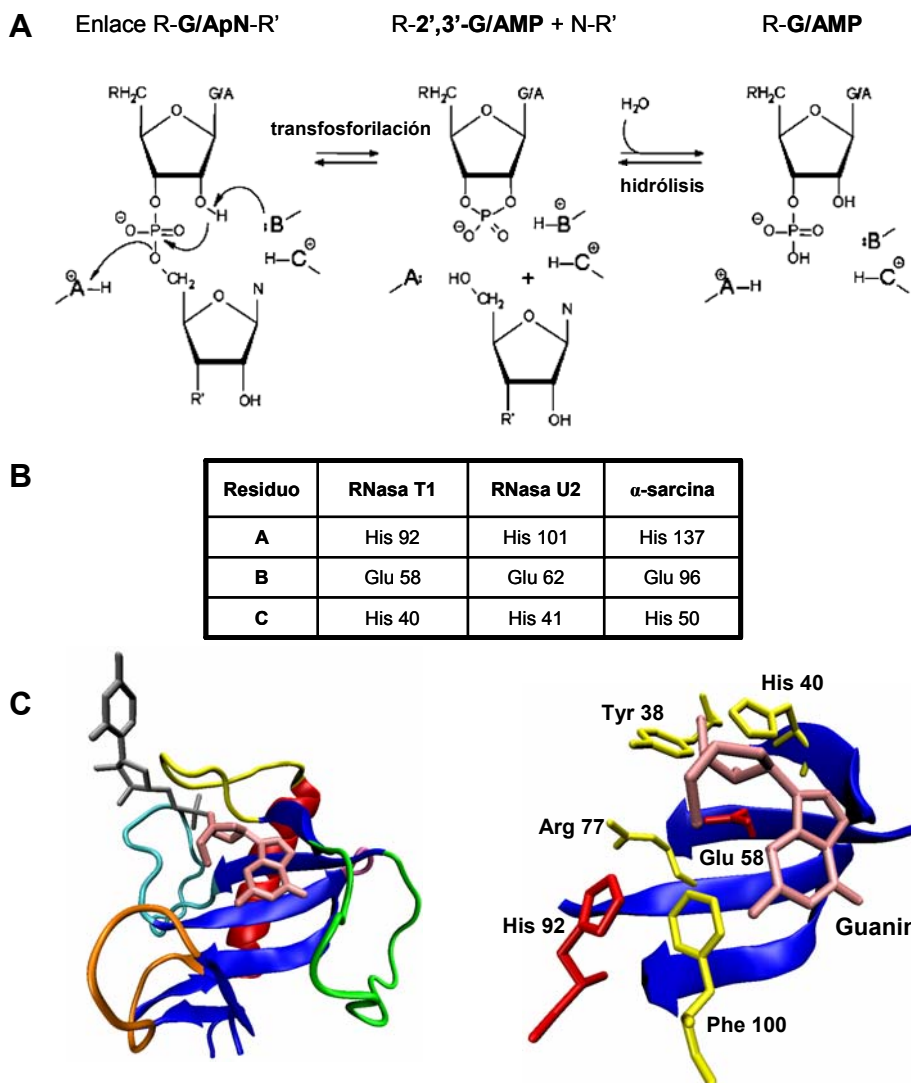


Figura 4: A: Mecanismo de hidrólisis de enlaces fosfodiéster de RNA por parte de las ribonucleasas extracelulares fúngicas. La especificidad y eficacia según el tipo de enlace (bases A o G en 3', N en 5') depende de la RNasa; el tipo de sustrato (dinucleótido, homo o heteropolinucleótido) viene determinado por la naturaleza de R y R'. Los principales residuos que contribuyen a la catálisis están representados de forma esquemática por las letras A, B y C. **B: Residuos implicados en las RNasas T1, U2 y α -sarcina.** A (ácido en la primera semirreacción, base en la segunda), B (base en la primera semirreacción, ácido en la segunda) y C, según el esquema mostrado en la parte A de la figura. **C: Acoplamiento del sustrato en la estructura de la RNasa T1 y detalle del centro activo,** deducido a partir de la estructura del complejo T1-análogo de GpU (entrada 1b2m en el PDB, Arni *et al.*, 1999). En rojo aparecen los residuos A y B según el esquema anterior; en amarillo, otros con implicación demostrada en la catálisis; en rosa, el extremo 3' del sustrato. Diagramas generados con el programa VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

En cuanto a la especificidad de corte, la preferencia por guanina está determinada por interacciones adicionales de residuos del entorno del centro activo, en especial las cadenas laterales de los residuos Tyr 42 y Glu 46 (Loverix *et al.*, 1997). Así, la eficacia catalítica frente a sustratos del tipo 3'-GpN-5' es del orden de 10^6 veces mayor que frente a 3'-ApN-5', a pesar de ser ambas bases púricas. Existe un sitio secundario de unión al sustrato encargado de discriminar la base en posición 5' según el siguiente orden de preferencia: GpU > GpA > GpC (Osterman y Walz, 1978). Con todo esto, el sustrato ideal para la RNasa T1 es 3'-GpC-5', lo que se justifica porque los residuos Asn 36 y Asn 98 producen un impedimento estérico en el hueco que deja el enlace 3'-P-5' (Steyaert *et al.*, 1992). Los parámetros enzimáticos de la T1 para este dinucleósido fosfato en condiciones óptimas de reacción son $K_M = 200\mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 350\text{s}^{-1}$ y $E_{\text{cat}} = 1600\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Steyaert, 1997). Las diferencias funcionales entre las distintas RNasas extracelulares microbianas se explican en muchos casos porque estos residuos adicionales no están conservados de forma tan general como los del centro activo (*Figura 2*). De hecho, ninguno de ellos (36, 42, 46 y 98) está presente en la familia de la barnasa bacteriana. Dentro de la propia familia T1 sólo aparece conservado en todos sus miembros el residuo Tyr 42. El Glu 46 cambia únicamente en la RNasa U2 y las dos asparaginas mencionadas varían bastante entre las secuencias de esta familia de RNasas.

Función biológica. A pesar del alto grado de conocimiento alcanzado en cuanto a la estructura y modo de acción de las RNasas de la familia T1, poco se puede decir acerca de su función biológica. Entre los escasos estudios al respecto, se relaciona en algunos de ellos la presencia de una RNasa extracelular (en concreto la binasa, homóloga a la barnasa) con cambios a nivel de membrana que aumentarían la permeabilidad iónica dando lugar a un efecto estimulante del crecimiento microbiano, aunque a elevadas concentraciones este efecto se transforma en toxicidad (Makarov e Ilinskaya, 2003).

La ribonucleasa U2

La RNasa U2 fue descubierta en 1968, al aislarse las ribonucleasas del medio extracelular del hongo basidiomiceto *Ustilago sphaerogena*, un parásito de plantas (Arima *et al.*, 1968a, b). Su particular especificidad por purinas en el extremo 3' del enlace que hidroliza, y no sólo guaninas como el resto de RNasas de la familia T1, hizo que empezara a ser utilizada para la secuenciación de RNA y la síntesis de oligonucleótidos, fines para los que aún sigue siendo empleada actualmente (Lehmann y Bass, 2000). Ha sido resuelta la estructura tridimensional de una isoforma modificada covalentemente, así como la de varios complejos con análogos de sustrato (Noguchi *et al.*, 1995; Noda *et al.*,

1997). Recientemente, su estudio se ha reactivado al ser considerada como el mejor modelo comparativo entre las RNasas de la familia T1 y las ribotoxinas, lográndose incluso el difícil objetivo de su expresión heteróloga, principal motivo de su anterior abandono (Martínez-Ruiz *et al.*, 2000, 2001; García-Ortega, 2004, 2005b).

Características estructurales. La RNasa U2 es, junto con la U1 (también de *Ustilago sphaerogena*), el miembro de la familia T1 que más se parece a las ribotoxinas (Kanaya y Uchida, 1986; Takahashi y Hashimoto, 1988). Posee alrededor de 10 aminoácidos más que el resto de proteínas de su familia (114 frente a 101-106) y su identidad de secuencia con las ribotoxinas es del 34%, lo que la sitúa a la menor distancia filogenética respecto a ellas (*Figuras 1, 2 y 3*). También se asemeja en el patrón de formación de puentes disulfuro, aunque incorpora uno más al de las ribotoxinas (la U1 reproduce exactamente el de estas) (*Figura 2*). En este sentido, el enlace entre las cisteínas 9 y 113 está muy conservado entre las RNasas extracelulares fúngicas, tanto de la familia T1 como de las ribotoxinas, pero el que involucra a las cisteínas 55 y 96 es característico de las últimas y sólo se repite en las RNasas no tóxicas secretadas por hongos basidiomicetos: U1, U2 y Po1.

Se ha descrito la presencia de dos isoformas al aislar la RNasa U2 de su fuente natural (Uchida y Shibata, 1981; Kanaya y Uchida, 1986). La isoforma mayoritaria, U2 A, es el producto original de la traducción del gen, mientras que la isoforma B posee un isoaspartato en la posición 32, modificación postraducciona que da lugar a una eficacia enzimática reducida, provocada, como se reveló espectroscópicamente, por pequeños cambios conformacionales en las proximidades del centro activo. La obtención de la estructura cristalina de esta isoforma (Noguchi *et al.*, 1995) permitió explicar la formación de esta modificación, al encontrarse el enlace Asn 32-Gln 33 justo antes de un bucle flexible que favorece el giro necesario de los ángulos de torsión entre estos residuos. Además, esta estructura demostró que la U2 mantiene el mismo plegamiento general del resto de miembros de su familia, superponiéndose de manera casi perfecta con la RNasa T1 (*Figura 5*), con la que presenta un 28% de identidad. Los aminoácidos adicionales que con respecto a ella presenta la U2 se localizan fundamentalmente en los bucles externos, siendo algo más largos los bucles 2 (44-59) y 3 (65-83) y el extremo aminoterminal (*Figuras 2 y 3*), características que la sitúan más cerca de las ribotoxinas que el resto de miembros de la familia T1.

Características funcionales. La principal diferencia de la RNasa U2 con la T1 en lo que a su funcionalidad se refiere radica en el intervalo de pH en el que ejerce su actividad fosfotransferasa. Este va de 3'5 a 5'5 en el caso de la U2, mientras que la T1 actúa en un intervalo mucho más amplio e incluso la U1 lo

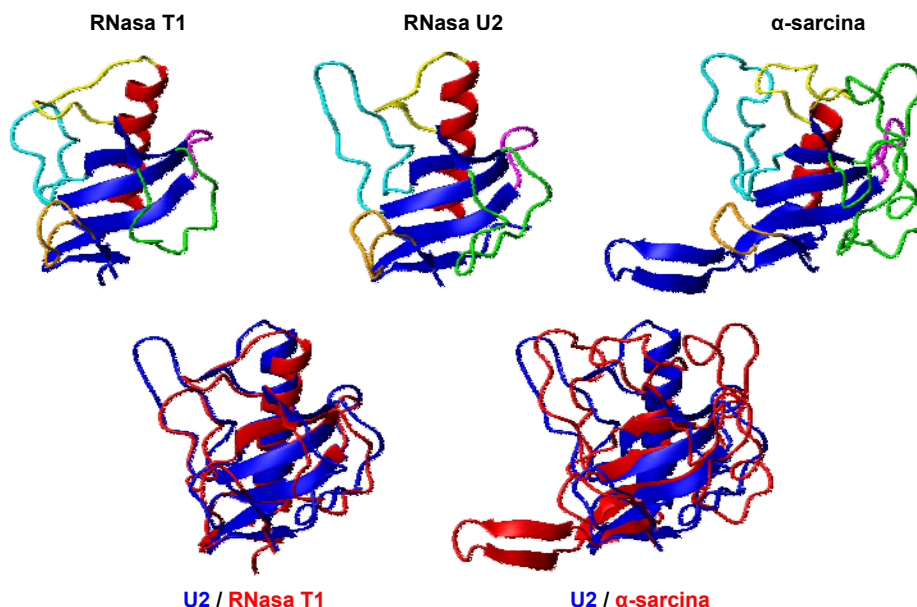


Figura 5: Superposición de la estructura de la RNasa U2 con las de la RNasa T1 y la α -sarcina. Se mantiene en la parte superior el código de colores empleado en las Figuras 2 y 3 para los distintos fragmentos de estructura secundaria. En las superposiciones se representa en azul la estructura de la RNasa U2 y en rojo las de la RNasa T1 (izquierda) y α -sarcina (derecha). Diagramas generados con el programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).

hace a pH neutro (Arima *et al.*, 1968a, b; Uchida y Egami, 1971). Se ha demostrado mediante estudios con distintos análogos de sustrato e intermedios de reacción que la RNasa U2 actúa siguiendo un mecanismo idéntico al de la T1, donde la primera etapa es reversible y la segunda, la hidrólisis del intermedio cíclico, mucho más lenta que en otros ejemplos de la familia. También ha sido posible gracias a estos estudios asignar los valores de pK_a de los residuos que participan como ácido y base en la catálisis (Koike *et al.*, 1971; Uchida y Egami, 1971; Yasuda e Inoue, 1982). Aunque las dificultades que inicialmente planteó su clonación impidieron la obtención de mutantes del centro activo que lo demostraran, estudios de superposición y modificación química indican que los residuos catalíticos en el caso de la U2 serían el Glu 62 y la His 101, contribuyendo también a la catálisis la His 41, la Arg 85 y la Phe 110 (Figuras 3 y 4) (Sato y Uchida, 1975a, b; Egami *et al.*, 1980; Noguchi *et al.*, 1995).

En lo que a la especificidad de corte se refiere, la preferencia para la base en 3' en el caso de la U2 sigue el orden $A > G \gg C > U$, aunque se pierde a elevadas concentraciones de enzima (Uchida *et al.*, 1970). Considerando el enlace completo, la ruptura es más eficaz en los enlaces Pu-Py y Py-Pu que entre bases del mismo tipo (indicándose los enlaces en el sentido 3'-5' y siendo Pu base purínica y Py, base pirimidínica) (Rushizky *et al.*, 1970). Estas diferencias de

especificidad pueden explicarse desde un punto de vista estructural considerando que la secuencia 43-46 de la T1, implicada en el reconocimiento de guanina, cambia considerablemente en la U2, y que el Asp 49 que en la primera interacciona con el agua en el sitio secundario de reconocimiento de base (en una secuencia FDF) es una Thr en la segunda (secuencia ITL) (*Figura 2*) (Takahashi y Hashimoto, 1988). Además, la disposición del bucle 2, al que pertenecen estos residuos, deja el centro activo menos accesible al disolvente, lo que explicaría la menor actividad de la RNasa U2 (*Figuras 3 y 5*). Con todo ello, también en lo que se refiere a la especificidad de corte la U2 es la RNasa que más se parece a las ribotoxinas.

Función biológica. Se ha descrito que la producción de RNasas por parte de *Ustilago sphaerogena* se induce por la presencia de RNA en el medio, lo que apunta hacia la utilización de este como fuente de carbono (Glitz y Dekker, 1964a). Más allá de esto, se conoce que el dimorfismo de otros hongos del género *Ustilago* entre las formas tipo levadura y filamentosa es esencial para la patogénesis, induciéndose esta última al acidificar o a pequeñas concentraciones de cAMP, en caso de falta de fuente de carbono (Sánchez-Martínez y Pérez-Martín, 2001). Ambas condiciones favorecerían la presencia de RNasa U2 en el caso en que se dieran también para su organismo productor.

La familia de las ribotoxinas

El descubrimiento de las ribotoxinas se remonta al año 1963, durante un programa de búsqueda de sustancias antibióticas y antitumorales iniciado 7 años antes por el Departamento de Salud de Michigan. Los filtrados de cultivos de un hongo procedente de una granja de este estado americano contenían una sustancia inhibidora del crecimiento de células de *sarcoma 180* y *carcinoma 755* inducidos en ratones (Jennings *et al.*, 1965). El hongo fue identificado como una cepa de *Aspergillus giganteus* y la proteína responsable de estos efectos recibió el nombre de α -sarcina (Olson y Goerner, 1965). Más tarde se encontraron otras dos proteínas antitumorales de similar actividad, la restrictocina y la mitogilina, producidas por *Aspergillus restrictus*, y comenzó a hablarse de una nueva familia de proteínas, a la que tardaría en unirse la Asp f 1, identificada casi tres décadas después como uno de los principales alérgenos de *Aspergillus fumigatus* (Arruda *et al.*, 1992). La inespecificidad exhibida por estas proteínas en su acción citotóxica (Roga *et al.*, 1971) hizo que su estudio se abandonara hasta mediados de los 70, cuando renació el interés por las ribotoxinas al demostrarse que eran capaces de inhibir la biosíntesis de proteínas mediante la degradación de un único enlace en la subunidad mayor del RNA ribosomal (Schindler y Davies, 1977; Endo y Wool, 1982). Este enlace resulta de particular interés por

localizarse en un sitio universalmente conservado del ribosoma con importantes implicaciones funcionales (Wool *et al.*, 1992) y que recibe el nombre de bucle sarcina/ricina (SRL). Tal denominación se debe a la acción que sobre él ejercen las toxinas α -sarcina y ricina, principales representantes de las ribotoxinas y las proteínas inhibidoras del ribosoma (RIPs), respectivamente. Precisamente esta semejanza en su actividad hizo que en su día se propusiera la inclusión de las ribotoxinas en la familia de las RIPs, pero ciertos autores (Nielsen y Boston, 2001; Peumans *et al.*, 2001) consideraron que esta última debía contemplar exclusivamente N-glicosidasas secretadas por plantas que producen la depurinización de un único nucleótido contiguo al enlace que rompen las ribotoxinas.

Hasta la fecha, se han descrito como ribotoxinas siete proteínas producidas por *Aspergillus* y se han caracterizado genes en otras cinco cepas del mismo género, además de seis en *Penicillium* y una más en *Neosartorya glabra*, lo que hace pensar que esta familia está más distribuida de lo que se pensaba inicialmente (Martínez-Ruiz *et al.*, 1999a).

Características estructurales. Todas las ribotoxinas son proteínas básicas de 149-150 aminoácidos, con dos puentes disulfuro perfectamente conservados a lo largo de la familia (Lacadena *et al.*, 2007). El primero de ellos, el que une los extremos amino y carboxilo terminales, aparece también en todas las RNAsas de la familia T1, mientras que el segundo, más interno, reproduce el que adicionalmente presentan los miembros de esta familia producidos por hongos basidiomicetos (U1, U2 y Po1) (Figura 2) (Wool, 1997; Martínez-Ruiz *et al.*, 1999a; Kao *et al.*, 2001). Existe un alto grado de identidad entre las secuencias de ribotoxinas conocidas (Rodríguez *et al.*, 1982; Sacco *et al.*, 1983; López-Otín *et al.*, 1984; Fernández-Luna *et al.*, 1985; Arruda *et al.*, 1992; Wirth *et al.*, 1997) y los porcentajes de identidad alcanzan el 85%. Las principales diferencias aparecen en las zonas amino y carboxilo terminales, así como en el bucle 2, aunque la mayoría de los cambios son conservativos.

Es precisamente en estas zonas donde las ribotoxinas se alejan más de las RNAsas de la familia T1. Así, como se puede observar en la estructura tridimensional de restrictocina y α -sarcina (Yang y Moffat, 1996; Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000; García-Mayoral *et al.*, 2005a), la horquilla aminoterminal de las primeras sobresale del núcleo principal de la proteína y es mucho más larga, como también lo es el bucle 2 de estructura aperiódica. En cuanto al resto de la molécula, la α -hélice central es algo más corta en las ribotoxinas y los bucles de estructura aperiódica presentan una disposición diferente respecto a los de la familia T1 (Figuras 3 y 5). Estos bucles, a pesar de su exposición al disolvente y carencia de estructura secundaria repetitiva, presentan conformaciones bien definidas, mantenidas por una compleja red de interacciones, tanto dentro de cada bucle aislado como de unos bucles con otros,

entre las que se encuentran enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas y puentes salinos (Yang y Moffat, 1996; Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000). Desde un punto de vista dinámico, estudios de RMN han demostrado que estos bucles están sometidos a una gran movilidad interna, en el intervalo que va de los pico a los nanosegundos (Pérez-Cañadillas *et al.*, 2002).

Características funcionales. Las ribotoxinas se comportan, al igual que las RNasas de la familia T1, como ribonucleasas ciclantes ácidas (Lacadena *et al.*, 1998) (*Figura 4*). Sin embargo, su especificidad por el sustrato va mucho más lejos que una simple preferencia por un tipo de nucleótido. Como ya se ha comentado, las ribotoxinas ejercen su acción ribonucleolítica sobre un único enlace del bucle SRL (*Figura 6*), en concreto el que une la G4325 y la A4326 del rRNA 28S (numeración del ribosoma de rata; G2661-A2662 en *E. coli*), liberando el denominado fragmento α (488 bases en el ribosoma de rata) (Endo y Wool, 1982; Endo *et al.*, 1983, 1988). Este único corte es suficiente para inhibir por sí mismo la biosíntesis de proteínas, ya que interfiere en la función de los factores de elongación (Brigotti *et al.*, 1989; Wool *et al.*, 1992). Finalmente, se desencadena la muerte celular por apoptosis (Olmo *et al.*, 2001).

Del mismo modo que ocurre con la RNasa U2 y su familia, la especificidad de las ribotoxinas se pierde a medida que aumenta la concentración de enzima. De forma cualitativa, se ha comprobado que todas las ribotoxinas que se han aislado a homogeneidad conservan su especificidad en el rango nanomolar. Sin embargo, a concentraciones del orden micromolar son capaces de hidrolizar RNA de forma exhaustiva, presentando preferencia por guanina en el extremo 3' (Endo *et al.*, 1983). Esta pérdida de especificidad se demuestra con la hidrólisis por parte de las ribotoxinas de diferentes análogos de sustrato, como es el caso de homopolinucleótidos del tipo poli(A), poli(G) o poli(I). Incluso se ha detectado actividad sobre dinucleósidos fosfato, considerados su sustrato mínimo, si bien el modo en que estos son reconocidos por la enzima parece tener mucho que ver con el sustrato natural. A pesar de ello, este tipo de sustratos han permitido estudiar el mecanismo catalítico de las ribotoxinas a nivel molecular, demostrando que se trata de ribonucleasas ciclantes ácidas con un centro activo prácticamente idéntico al de las RNasas de la familia T1 (Lacadena *et al.*, 1998, 1999) (*Figura 3*). Sin embargo, su eficacia catalítica es varios órdenes de magnitud menor que la de las RNasas inespecíficas. Así, la principal ventaja de las ribotoxinas frente a sus homólogas no tóxicas radica en su extraordinaria especificidad: considerando como sustrato el ribosoma completo, las ribotoxinas son mucho más eficaces que las RNasas inespecíficas, ya que son capaces de inactivarlo mediante la hidrólisis de un único enlace entre los más de 7.000 presentes en el ribosoma (Endo *et al.*, 1983).

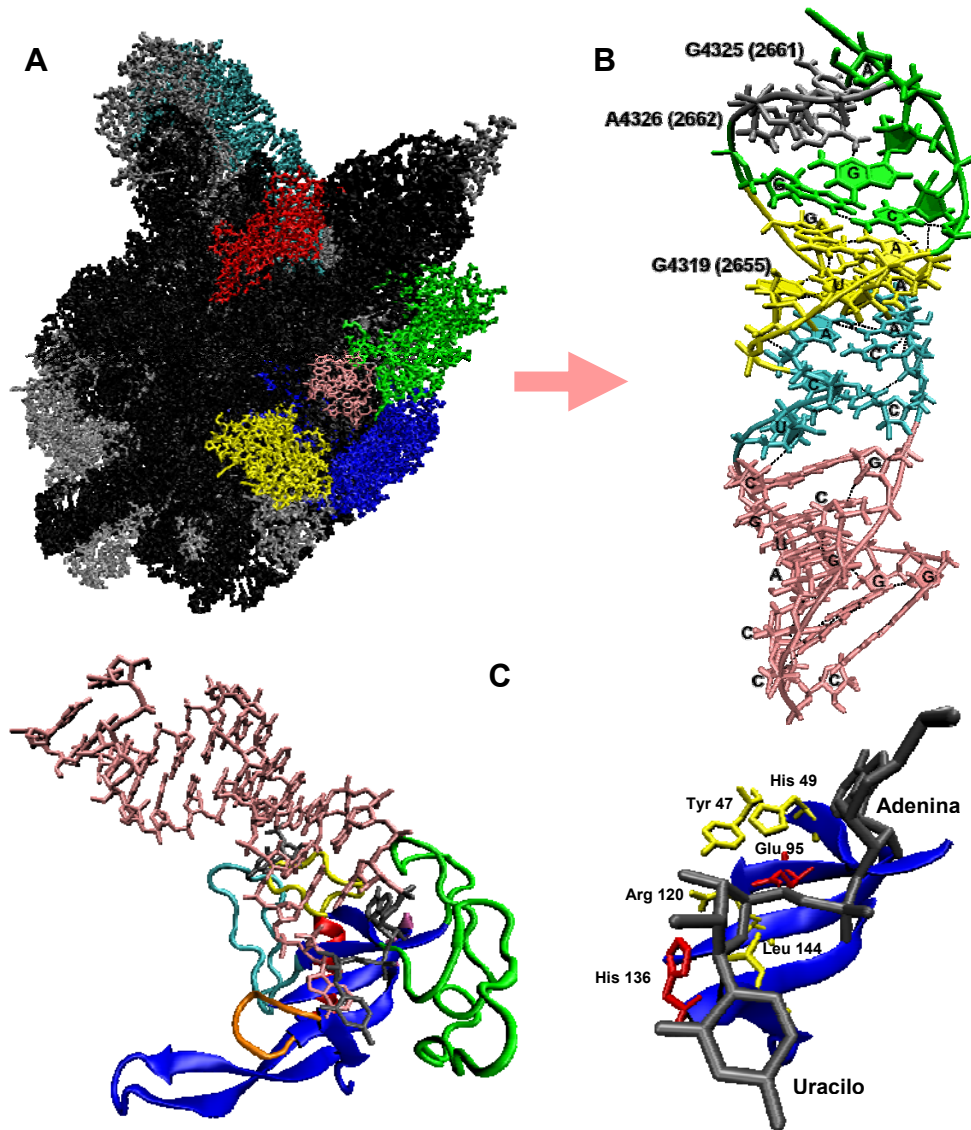


Figura 6: A: Localización del SRL en el ribosoma de *Haloarcula marismortui* (entrada 1JJ2 del PDB). En negro, el rRNA 23S; en azul claro, el rRNA 5S; en rojo, verde, azul y amarillo, las proteínas ribosomales 10e, L6, L3 y L14, respectivamente; en gris, otras proteínas ribosomales. El SRL se destaca en rosa. **B: Estructura del bucle SRL** (1SCL en PDB) La numeración corresponde a la secuencia del ribosoma de rata (entre paréntesis, la correspondencia en *E. coli*). En rosa, la zona con apareamientos de Watson y Crick; en azul, la región previa a la G prominente (4319) y el giro S (amarillo) de apareamientos no canónicos; en verde, el tetrabucle, destacando en gris las bases sobre cuyo enlace actúan las ribotoxinas. **C: Estructura del complejo restrictocina-análogo del SRL** (1JBS en PDB). Se emplea para la proteína el mismo código de colores de las Figuras 2 y 3; en el SRL se destacan en gris la G prominente, en interacción con los bucles 1 y 3, y las bases cuyo enlace es objeto de corte. A la derecha, detalle del acoplamiento de estas en el centro activo (el tetrabucle se halla distorsionado en este análogo de sustrato y por ello no se corta). Diagramas generados con el programa VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

Esta especificidad, que las convierte en toxinas extraordinariamente eficaces, depende del reconocimiento por parte de las ribotoxinas de una zona muy concreta del ribosoma. El SRL se encuentra en el dominio VI del rRNA 28S (23S en procariotas) y está formado por un tallo de 30-35 nucleótidos de RNA en doble hélice con una secuencia universalmente conservada y una estructura compacta en la que destacan, como principales características, la presencia de varios pares purina-purina, un tetrabucle GAGA y una G prominente adyacente a un par AU de Hogsteen inverso. El conjunto se halla estabilizado por una serie de interacciones inusuales entre bases y una red de enlaces de hidrógeno entre protones de los grupos imino y oxígenos de los grupos fosfato (Szewczak *et al.*, 1993; Szewczak y Moore, 1995; Seggerson y Moore, 1998) (*Figura 6B*). El reconocimiento del SRL por parte de las ribotoxinas parece darse a través de la G prominente y el giro S en el que esta se encuentra, que interaccionarían con los bucles 1 y 3 de la proteína, siendo dicho nucleótido el único realmente esencial para la actividad ribonucleolítica específica (Macbeth y Wool, 1999a). Así se deduce de la estructura cristalina del complejo formado por la restrictocina y un análogo del SRL (Yang *et al.*, 2001) (*Figura 6C*). El bucle 2, con abundancia de cargas positivas, podría estar implicado en interacciones con el tetrabucle que contiene el enlace a hidrolizar. Una vez anclada la ribotoxina, esta ejercería su acción sobre el enlace GA situado a 12 Å de la G prominente, aunque no parece ser estrictamente necesario que en este enlace participe otra G (Glück y Wool, 1996). Por último, parece que la interacción RNA-proteína induce un cambio de conformación en el tetrabucle GAGA para permitir la reacción de hidrólisis a través del intermedio cíclico (Correll *et al.*, 1998).

No obstante, todas estas interacciones con el SRL no explicarían por sí mismas la extraordinaria especificidad de las ribotoxinas frente a los ribosomas sobre los que actúan. Se ha demostrado recientemente que el contexto ribosomal incrementa la eficacia de reacción en varios órdenes de magnitud, lo que podría relacionarse con la existencia de interacciones electrostáticas de la proteína con el ribosoma (Korennykh *et al.*, 2006, 2007). Las ribotoxinas son proteínas básicas cuya superficie expone gran cantidad de cadenas laterales cargadas y polares (Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000), lo que estaría de acuerdo con una localización electrostática del ribosoma por parte de las ribotoxinas y posterior difusión de estas hacia el SRL. Por otro lado, la gran movilidad interna que presentan ciertas regiones de la estructura de estas proteínas podría permitir la accesibilidad de la molécula a otros potenciales sitios de reconocimiento, lo que incrementaría la probabilidad de éxito en la unión. Así, una de las regiones con mayor flexibilidad conformacional en el caso de la α -sarcina es la horquilla N terminal (aminoácidos 1-26) (Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000; García-Mayoral *et al.*, 2005a). La obtención de los mutantes de delección α -sarcina Δ (7-22) y Asp f 1 Δ (7-22) permitió comprobar que estas variantes mantenían su actividad ribonucleolítica frente a dinucleósidos fosfato, así como la capacidad para

degradar específicamente oligonucleótidos sintéticos que reproducían la secuencia y estructura del SRL, pero no podían actuar sobre ribosomas intactos, resultando mucho menos citotóxicas (García-Ortega *et al.*, 2002, 2005a). La estructura tridimensional en solución del mencionado mutante de delección de la α -sarcina mostró que conservaba el plegamiento general de la proteína silvestre, incluida la conformación espacial de los bucles de estructura aperiódica (García-Mayoral *et al.*, 2004). La construcción de un modelo de reconocimiento del ribosoma usando las estructuras tridimensionales de la α -sarcina y su mutante Δ (7-22) permitió identificar dos nuevas zonas de interacción adicionales al SRL (García-Mayoral *et al.*, 2005b). La primera de ellas implicaría a una pequeña región del bucle 2 de la α -sarcina y a la proteína ribosomal L6, mientras que la segunda supondría el contacto entre la horquilla β y la proteína L14 (Figura 7). Esta última interacción no podría establecerse en el caso del mutante de delección y resultaría crucial para el reconocimiento específico del ribosoma, como demuestran los resultados obtenidos con esta variante. Esta conclusión se ve apoyada por la observación de que se puede encontrar una secuencia homóloga a la región 11-16 de la α -sarcina en EF-2 de *S. cerevisiae* (Kao y Davies, 1999; García-Mayoral *et al.*, 2005b). Por otra parte, la variabilidad de secuencias en la zona de interacción de la familia de proteínas a la que pertenece la L14 explicaría la diferencia de especificidad de las ribotoxinas en función de la especie a la que pertenezcan los ribosomas ensayados (Schindler y Davies, 1977; Endo y Wool, 1982; Endo *et al.*, 1983; Uchiumi *et al.*, 2002; García-Mayoral *et al.*, 2005b).

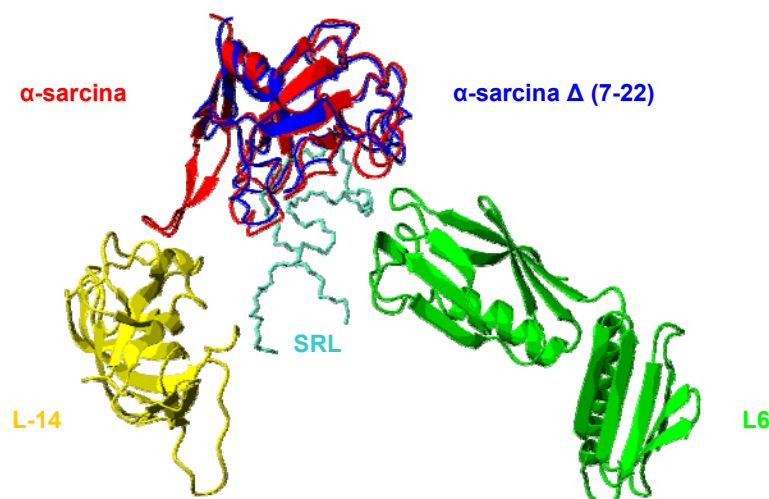


Figura 7: Modelo de la interacción de la α -sarcina y su mutante Δ (7-22) con el SRL y las proteínas ribosomales L6 y L14 (García-Mayoral *et al.*, 2005b). Entradas del PDB 1DE3, 1R4Y y 430D para α -sarcina, mutante Δ (7-22) y SRL, respectivamente. Se mantiene para las proteínas ribosomales el código de colores empleado en la Figura 6A. Diagramas generados con el programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).

Para terminar de explicar el carácter citotóxico de las ribotoxinas, hay que hacer referencia a su capacidad para interaccionar con membranas. Esta supone la principal diferencia respecto a las RNasas de la familia T1, además de ser el factor limitante de la citotoxicidad. La mayoría de los estudios a este respecto se han llevado a cabo con la α -sarcina, de cuyo caso particular se hablará más adelante, y han permitido deducir que existe una clara preferencia por fosfolípidos ácidos (Gasset *et al.*, 1991a; Mancheño *et al.*, 1998a). Esto podría explicar la preferencia que exhiben las ribotoxinas por células diana de tipo tumoral o infectadas por virus, en las que la pérdida de simetría de la membrana plasmática expone al medio extracelular una concentración de fosfatidilserina mucho mayor que la que se da en una célula normal (Bergelson *et al.*, 1970; Turnay *et al.*, 1993; Orntoft y Vestergaard, 1999; Ran *et al.*, 2002).

Función biológica. Al igual que sucede con las RNasas de la familia T1, poco se conoce al respecto de la posible función biológica de las ribotoxinas. Existen estudios en los que se ha relacionado su expresión con la maduración de los conidióforos de los hongos que las producen, al encontrarse mayoritariamente en los primeros pasos de este proceso y no en las hifas (Brandhorst y Kenealy, 1992). Más recientemente se ha sugerido que su función sería evitar la destrucción del hongo por parte de insectos, como escarabajos, con los que actúa de forma sinérgica al parasitar algunas especies de gramíneas (Brandhorst *et al.*, 1996). Los conidios sólo serían ingeridos una vez maduros, y por tanto resistentes, lo que favorecería su dispersión para la colonización que han de llevar a cabo.

Alergenicidad. Se suelen identificar como alérgenos aquellas sustancias reconocidas por los anticuerpos IgE contenidos en el suero de pacientes alérgicos. En este sentido, las ribotoxinas han sido relacionadas con alergias causadas por *Aspergillus*, principal género productor de esta familia de proteínas y el más importante responsable de las patologías y síndromes alérgicos en humanos debidos a infecciones fúngicas (Kurup *et al.*, 2002; Kurup, 2003). Inicialmente, se encontraron ribotoxinas en la orina de pacientes con aspergilosis diseminada (Arruda *et al.*, 1990; Lamy *et al.*, 1991) y se probó mediante anticuerpos que se acumulaban en las proximidades de los nodos de infección fúngica (Lamy *et al.*, 1991). Desde entonces, la principal ribotoxina estudiada como alérgeno es Asp f 1 de *Aspergillus fumigatus*. Esta toxina está implicada en la patogenicidad provocada por aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), como prueban los altos niveles de IgE específica frente a esta proteína presentes en sueros de pacientes con tal afección (Kurup *et al.*, 1994; García-Ortega *et al.*, 2005a). Asp f 1 fue además el primer alérgeno recombinante ensayado *in vivo* (Moser *et al.*, 1992), con total concordancia en las pruebas serológicas (Moser *et al.*, 1992; Crameri *et al.*, 1998; Hemmann *et al.*, 1999),

pero su citotoxicidad impidió que progresara su aplicación terapéutica. La reciente obtención de la variante delecionada Asp f 1 Δ (7-22) permitió comprobar que uno de los principales determinantes alergénicos de esta proteína, si bien no el único, se localizaba en la horquilla N terminal, al presentar este mutante una reducción en la reactividad frente a anticuerpos IgE específicos para Asp f 1 con respecto a la proteína completa (García-Ortega *et al.*, 2005a). La ausencia de actividad citotóxica de estas variantes delecionadas de ribotoxinas las convierte en moléculas prometedoras en cuanto a su uso en terapia y diagnóstico de la hipersensibilidad hacia *Aspergillus*, aunque esta posibilidad todavía debe ser corroborada *in vivo*. Con este propósito, se encuentra actualmente en desarrollo un sistema de ratón alérgico sensibilizado frente a Asp f 1.

Immunoterapia con ribotoxinas. Las inmunotoxinas se han erigido en una potente alternativa para el tratamiento de enfermedades gracias a la posibilidad que ofrecen de dirigir su acción específicamente sobre determinados tipos celulares, como es el caso de las células tumorales. El diseño de estas moléculas se basa en el concepto de “balas mágicas” introducido por Ehrlich en 1906, según el cual estas consistirían en moléculas transportadoras, específicas para el reconocimiento de células cancerosas, que dirigirían agentes tóxicos a estos tejidos neoplásicos (Ehrlich, 1956; Sandvig y van Deurs, 2000). El descubrimiento de los anticuerpos monoclonales en 1975 permitió diseñar nuevas inmunotoxinas dirigidas específicamente contra determinados tumores gracias a su unión con antígenos específicos de células cancerosas, produciendo su muerte por la acción de la toxina una vez introducida en las mismas. El diseño de inmunotoxinas antitumorales ha implicado el uso de diferentes toxinas bacterianas, así como de proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) de plantas u hongos, sobre todo la ricina (Ghetie *et al.*, 1993; Engert *et al.*, 1997; Schnell *et al.*, 1998). El carácter citotóxico de las ribotoxinas frente a carcinomas, junto con su elevada termoestabilidad, baja inmunogenicidad y resistencia a proteasas, las convierte en candidatos ideales para abordar la construcción de una inmunotoxina y así se realizaron inicialmente intentos por conjugación química con la restrictocina (Orlandi *et al.*, 1988; Conde *et al.*, 1989; Rathore y Batra, 1996), la mitogilina (Better *et al.*, 1992) y la α -sarcina (Wawrzynczak *et al.*, 1991; Rathore *et al.*, 1997). Las inmunotoxinas basadas en esta última proteína desprendieron resultados prometedores en los ensayos preliminares (Wawrzynczak *et al.*, 1991), pero no progresaron hacia estudios *in vivo*, quizás porque su gran tamaño impedía la correcta entrada en tumores sólidos o por baja estabilidad del inmunoconjugado.

Las inmunotoxinas de segunda generación pretenden resolver estos problemas ligando la toxina a una cadena sencilla de anticuerpo que contenga sólo los dominios variables, necesarios para el reconocimiento del antígeno.

Inmunotoxinas recombinantes de este tipo se han obtenido ya para la restrictocina (Rathore y Batra, 1997a, b). Recientemente se ha logrado la expresión en *Pichia pastoris* de una inmunotoxina de cadena sencilla que une la estructura de la α -sarcina a los dominios variables del anticuerpo monoclonal B5, específico para el carbohidrato tipo Lewis^Y, antígeno sobreexpresado en la superficie de numerosos carcinomas, como son los tumores sólidos de mama y colon (Lacadena *et al.*, 2005; Carreras-Sangrà *et al.*, resultados sin publicar).

Biotecnología. En los últimos años, el desarrollo de la vacunación por vía oral utilizando bacterias Gram positivas como probióticos se ha convertido en una aproximación prometedora para el tratamiento de varias patologías humanas, como las alergias, gracias a la catalogación de algunos de estos microorganismos como “generalmente seguros” (*Generally Regarded As Safe*, GRAS) (Pouwels *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1997; Kirjavainen *et al.*, 1999; Maassen, 1999; Steidler *et al.*, 2000). Una de estas bacterias Gram positivas es *Lactococcus lactis*, un microorganismo no patógeno, no invasivo y no colonizador principalmente utilizado en la producción de alimentos fermentados, pero también empleado, por ejemplo, en la producción de interleuquina 10 para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino en ratones (Steidler *et al.*, 2000). Aunque *Lactococcus lactis* atraviesa de forma rápida el tracto gastrointestinal sin colonización del mismo (Gruzza *et al.*, 1994; Klijn *et al.*, 1995), versiones genéticamente modificadas de esta bacteria resultan efectivas presentando antígenos al sistema inmune de las mucosas e induciendo respuestas inmunes locales (Robinson *et al.*, 1997; Maassen, 1999; Adel-Patient *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2005). Adicionalmente, los antígenos de *Lactococcus* están protegidos del contacto directo con el ácido gástrico y enzimas proteolíticas.

De acuerdo con todo ello, la cepa de *Lactococcus lactis* MG1363 ha sido empleada recientemente para producir y secretar las ribotoxinas Asp f 1 y α -sarcina, así como tres variantes con citotoxicidad reducida o menor afinidad por IgE, tales como los ya mencionados mutantes de delección Δ (7-22) de ambas proteínas y el mutante H137Q de la α -sarcina (Álvarez-García *et al.*, 2008). Las proteínas son secretadas en forma nativa y activa cuando el medio extracelular se tampona a pH 8.0. La administración intragastrointestinal tanto de las bacterias sin transformar como de la cepa productora de α -sarcina no produce ningún efecto dañino en el tracto intestinal de los ratones, lo que indica que incluso la forma tóxica de la proteína puede ser liberada de forma segura usando este microorganismo en la administración oral (Álvarez-García *et al.*, 2008). Por tanto, la posible utilización de *Lactococcus lactis* como potencial sistema de administración de variantes hipoalergénicas de Asp f1 y de ribotoxinas en general como agentes antitumorales frente a diferentes tumores gastrointestinales debe ser tomada en consideración, si bien aún se requieren estudios más profundos en este sentido.

La α -sarcina

Secretada por el hongo *Aspergillus giganteus*, la α -sarcina fue la primera ribotoxina descubierta (Olson y Goerner, 1965) y es la más estudiada. Su clonación y el diseño de un sistema de producción heteróloga, dirigida al periplasma de *E. coli*, con su secuencia nativa completa (Lacadena *et al.*, 1994), así como la purificación de la proteína recombinante soluble con buen rendimiento han permitido su caracterización exhaustiva tanto a nivel estructural como funcional. Todo ello ha contribuido a que la α -sarcina se haya convertido en el mejor modelo de estudio de la familia de las ribotoxinas, además de servir como referencia en las comparaciones establecidas entre estas y las RNasas de la familia T1.

Características estructurales. Los 150 aminoácidos que componen la secuencia de la α -sarcina se pliegan dando lugar a una estructura que mantiene el patrón general ya descrito para las ribotoxinas (*Figura 3*), con un núcleo central compuesto por una lámina β antiparalela de cinco hebras y una hélice α de casi tres vueltas. La lámina está formada por las hebras $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$ y $\beta 7$, dispuestas en una topología -1, -1, -1, -1 (Campos-Olivas *et al.*, 1996a; Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000). La hélice α se acopla ortogonalmente a la cara convexa de esta lámina, quedando el centro activo hacia el lado cóncavo, con las cadenas laterales orientadas hacia el exterior. Las hebras $\beta 1$ y $\beta 2$ conforman la horquilla N terminal, que puede considerarse como dos horquillas β menores unidas por una región bisagra. La primera de ellas está más próxima al extremo abierto de la horquilla, mientras que la segunda está compuesta por dos hebras cortas conectadas por un giro β de tipo I. Este último extremo de la horquilla N terminal queda expuesto hacia el disolvente y presenta una elevada movilidad (*Figura 8*), lo que tiene importantes implicaciones funcionales, como ya se ha comentado anteriormente. Los dos puentes disulfuro característicos de esta familia de proteínas se encuentran aquí uniendo las cisteínas en las posiciones 6-148 y 76-132 (*Figura 2*). En cuanto a los bucles de estructura aperiódica, cabe destacar la abundante presencia en ellos de residuos cargados positivamente, contribuyendo a un punto isoelectrico altamente básico, así como su gran movilidad (Pérez-Cañadillas *et al.*, 2002). Mención especial merece el bucle 2, rico en Gly y Lys y con una conformación muy definida a pesar de su elevada movilidad. La región 52-54 de este bucle está prácticamente fija en el seno de la estructura e incluye la Asn 54, residuo conservado entre las RNasas extracelulares fúngicas (Mancheño *et al.*, 1995b), que establece un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo de la Ile 69 a través del protón del grupo amida de su cadena lateral. Esta interacción también está conservada en las RNasas de la familia T1 (Sevcik *et al.*, 1991; Pfeiffer *et al.*, 1997; Hebert *et al.*, 1998) y se ha propuesto que la región 52-55 de la restrictocina podría formar el bolsillo de



Figura 8: Representación tubular de los 47 conformeros de la α -sarcina obtenidos por RMN (Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000). La anchura de la sección es inversamente proporcional al grado de definición, lo que se relaciona bien con el dinamismo de las distintas regiones de la proteína (Pérez-Cañadillas *et al.*, 2002). El código de colores es el mismo que en las Figuras 2 y 3.

reconocimiento de sustrato (Yang y Moffat, 1996). Esta hipótesis parece confirmarse con los resultados obtenidos para los mutantes de la Asn 54 de la α -sarcina, situada en la región equivalente (53-56).

Estudios de desnaturalización térmica, tanto por calorimetría diferencial de barrido como por medidas de dicroísmo circular, han permitido certificar la elevada estabilidad de la α -sarcina, encontrándose para ella una temperatura de transición en torno a los 56°C (Gasset *et al.*, 1995b). Por lo demás, es digna de mención la presencia de hasta 8 Tyr y 2 Trp, que han permitido gran variedad de estudios espectroscópicos, algunos de ellos conducentes a la obtención de los valores de pK_a correspondientes a transiciones conformacionales inducidas por cambios de pH (Martínez del Pozo *et al.*, 1988; De Antonio *et al.*, 2000). Estos resultados han sido más tarde completados con la determinación mediante estudios de RMN de los valores de pK_a de la totalidad de los residuos de la proteína (García-Mayoral *et al.*, 2003), estudios que se han extendido también a algunos mutantes de residuos del centro activo (García-Mayoral *et al.*, 2003, 2006). Tan detallada caracterización estructural ha culminado con la determinación de los distintos estados de tautomerización de todas las histidinas de la molécula (Pérez-Cañadillas *et al.*, 2003).

Características funcionales. El centro activo de la α -sarcina está formado por los aminoácidos Tyr 48, His 50, Glu 96, Arg 121, His 137 y Leu 145, todos ellos homólogos a sus correspondientes en la RNasa T1 (Figura 3). Los residuos His 50, Glu 96 e His 137 son catalíticos y actúan según un mecanismo ciclante (Figura 4) (Lacadena *et al.*, 1998, 1999). Sin embargo, los residuos Glu 96 e His 137 parecen ser los únicos esenciales, habiéndose propuesto que la Tyr 48 podría desempeñar el papel de la His 50 en ausencia de esta. Estudios con los residuos Arg 121, Leu 145 y Tyr 48 han confirmado su participación en la funcionalidad de la proteína (Masip *et al.*, 2001, 2003; Álvarez-García *et al.*, 2006). En particular, la Arg 121 está implicada en la orientación de sustratos grandes dentro del centro activo y su carga positiva es esencial para la interacción de la proteína con membranas (Masip *et al.*, 2001). La Leu 145 mantiene interacciones con la His 137 y es en parte responsable de su bajo pK_a , además de estar relacionada con la particular orientación del bucle 5

en las ribotoxinas, que disminuye la accesibilidad del centro activo al disolvente (*Figura 5*) (Masip *et al.*, 2003). Por último, la mutación de la Tyr 48 cambiándola por Phe da lugar a una variante inactiva frente a los ribosomas pero que retiene su capacidad de degradar ApA, lo que revela el papel esencial que desempeña el anillo fenólico en la degradación de RNA polimérico (Álvarez-García *et al.*, 2006). Estos tres residuos podrían estar involucrados en favorecer la reorientación de base que mediante la distorsión del enlace a hidrolizar necesita llevar a cabo la tríada catalítica para permitir el corte de un único enlace fosfodiéster (Yang *et al.*, 2001; Álvarez-García *et al.*, 2006).

Como ya se ha descrito para el resto de proteínas de la superfamilia, la α -sarcina está también sometida a pérdida de especificidad a elevadas concentraciones de enzima. En estas condiciones, se ha observado que degrada poli(A), poli(G) y poli(I) (Endo *et al.*, 1983), algo que también ocurre con la RNasa U2, con un perfil de actividad frente al pH restringido a valores ácidos. Estudios con dinucleósidos fosfato han permitido la determinación de parámetros cinéticos para la α -sarcina, obteniéndose frente a ApA valores de $K_M = 40\mu\text{M}$ y $k_{\text{cat}} = 1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ (Lacadena *et al.*, 1998), lo que supone una eficacia catalítica ocho veces menor que la de la RNasa T1. Uno de los factores determinantes es la ya mencionada restricción al disolvente que sufre el centro activo de la α -sarcina por parte de los bucles que lo rodean, especialmente el bucle 5. Tanto las interacciones de este bucle con la horquilla aminoterminal como su longitud repercuten en el entorno de la histidina catalítica principal (His 137 en α -sarcina). Esto explicaría las diferencias en la eficacia catalítica, pero no en la especificidad, por lo que se sugiere que existan interacciones del sustrato con otros bucles.

En el caso del ribosoma, sustrato natural de la α -sarcina, la región rica en Lys del bucle 3 estaría implicada en interacciones con las cargas negativas del esqueleto fosfodiéster que circunda la G prominente, mientras que algunos residuos del bucle 5 y la región 52-55 del bucle 2, que contiene la ya mencionada Asn 54, contactarían con el tetrabucle GAGA que incluye el enlace objeto de hidrólisis (*Figura 6C*). También se ha hablado ya de las interacciones adicionales con proteínas ribosomales y del papel desempeñado en este sentido por la horquilla N terminal (*Figura 7*). Todas estas interacciones contribuyen a la extraordinaria especificidad de la α -sarcina por el sustrato frente al que parece haber sido diseñada y al que inactiva con una eficacia catalítica ($k_{\text{cat}}/K_M = 1.7 \times 10^{10} \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) comparable a la de las enzimas más rápidas conocidas (Korennykh *et al.*, 2006). Su acción es tan eficaz que se ha llegado a decir que una sola molécula de α -sarcina es suficiente para matar una célula (Lamy *et al.*, 1992).

A este respecto, aunque se conoce poco acerca del mecanismo por el cual las ribotoxinas en general son capaces de penetrar en las células, los datos más concluyentes se han obtenido también con la α -sarcina. En lo que a su interacción con membranas se refiere, se ha comprobado que la α -sarcina

interacciona con vesículas compuestas por fosfolípidos ácidos, como la fosfatidilserina o el fosfatidilglicerol, a pH neutro o ligeramente ácido (Gasset *et al.*, 1989, 1991a). Experimentos de unión permitieron determinar una $K_d = 60.0\text{nM}$ para la formación de complejos lípido-proteína, capaz de generar agregación que derivaba en fusión, pero que se impedía a pH básico (Gasset *et al.*, 1990). En la etapa inicial de dicha agregación la proteína actúa como puente para dimerizar vesículas (Mancheño *et al.*, 1994a). La α -sarcina es capaz de pasar al interior de las vesículas gracias a una posterior interacción hidrófoba (Oñaderra *et al.*, 1993; Gasset *et al.*, 1994, 1995a), en la que está implicada la región 116-139, como se demostró con un péptido sintético con esa secuencia (Mancheño *et al.*, 1995a). Incluso un péptido que comprendía únicamente la secuencia 131-139 era capaz de mimetizar los efectos de la proteína completa (Mancheño *et al.*, 1998b). El paso a través de las membranas se corresponde con el descenso de estabilidad de la proteína al interactuar con ellas (Oñaderra *et al.*, 1993; Gasset *et al.*, 1995b) y la aparición de cambios estructurales (Gasset *et al.*, 1991b; Mancheño *et al.*, 1994b), pero una vez dentro se mantiene la conformación necesaria para ejercer actividad ribonucleolítica. El mutante de delección α -sarcina Δ (7-22) ha demostrado que el extremo N terminal está implicado en la interacción con lípidos, aunque no hay evidencias de que lo esté el bucle 2, como se ha llegado a proponer (Martínez del Pozo *et al.*, 1988; Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000). Ninguno de los residuos de Trp son necesarios para la interacción (De Antonio *et al.*, 2000), pero estudios con el mutante R121Q han demostrado el papel crítico que esta Arg desempeña en el proceso (Masip *et al.*, 2001). Este interesante resultado ha conducido a que se proponga que las proteínas que han evolucionado para interactuar con RNA, como las ribotoxinas, habrían desarrollado determinantes estructurales y químicos para reconocer redes de polifosfato que les permitirían interactuar también con membranas lipídicas (Masip *et al.*, 2001).

De modo general, la basicidad de la proteína parece ser uno de los factores clave en la citotoxicidad, como ya se ha visto para otras RNasas (Di Donato *et al.*, 1994; Vatzaki *et al.*, 1999; Ilinskaya *et al.*, 2002). El paso a través de la membrana es la etapa limitante del comportamiento citotóxico (Turnay *et al.*, 1993), lo que se confirma por el hecho de que la restrictocina, con menor capacidad de interacción con fosfolípidos, resulta menos citotóxica que la α -sarcina (García-Ortega *et al.*, 2001). Esta última penetra en la célula vía endocitosis sin que se haya encontrado receptor alguno. La llegada al citoplasma transcurre a través de endosomas ácidos, independiente de clatrina, con posterior paso por el aparato de Golgi (Figura 9) (Olmo *et al.*, 2001). Estudios con células de rhabdomyosarcoma muestran que finalmente se desencadena la muerte celular por apoptosis, aunque esta no parece ser exclusivamente una consecuencia directa de la inhibición de la biosíntesis proteica, como se deduce del análisis comparativo de los efectos de la α -sarcina y la cicloheximida (Olmo *et al.*,

2001). Sin embargo, de acuerdo con todo lo dicho hasta ahora, todas las variantes de la proteína consistentes en mutaciones en residuos esenciales para la actividad enzimática, algunos de ellos con capacidad de interacción con lípidos idéntica a la de la proteína completa, muestran pérdida de la citotoxicidad, especialmente el mutante Δ (7-22) (García-Ortega *et al.*, 2002), lo que pone de manifiesto la relación existente entre actividad ribonucleolítica y capacidad citotóxica.

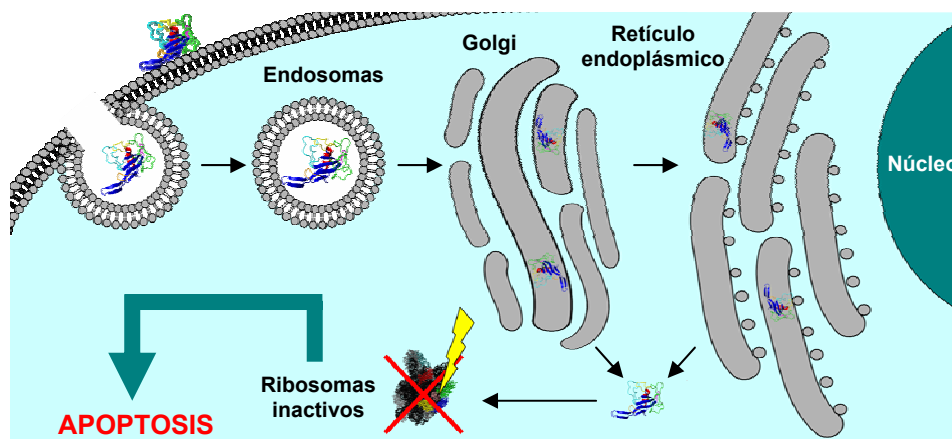


Figura 9: Esquema del mecanismo de entrada y acción de la α -sarcina en la célula diana. Tras interacción con la membrana, la proteína es endocitada y transportada por endosomas ácidos, de modo independiente de clatrina, hacia el trans-Golgi. Posteriormente es liberada al citosol, donde ejerce su acción ribonucleolítica sobre los ribosomas. Finalmente, se desencadena la muerte celular por apoptosis.

La hipótesis del intermedio evolutivo

Después de todo lo hasta aquí expuesto, parece justificado pensar que las ribotoxinas puedan ser el resultado de un proceso de ingeniería natural según el cual habrían evolucionado a partir de las RNasas inespecíficas de la familia T1 (Kao y Davies, 1995). Así, las actividades añadidas que las ribotoxinas presentan respecto a sus supuestas predecesoras se deberían principalmente a variaciones en el ordenamiento y longitud de sus bucles de estructura aperiódica y de su extremo aminoterminal, los cuales habrían evolucionado a partir de la estructura general de una proteína de la superfamilia de las RNasas microbianas extracelulares, quizás una RNasa específica de guanina o de purinas. Siendo esto así, sería lógico pensar que pudieran existir intermedios evolutivos que hubieran ido adquiriendo sólo algunas de las regiones extra que confieren las actividades adicionales de las ribotoxinas.

Un caso similar se encuentra en las RNAsas de mamíferos de la superfamilia de la RNasa A. Estudios comparativos han llevado a establecer para este grupo dos grandes familias de genes, la de la RNasa A y la de la RNasa seminal bovina (Beintema *et al.*, 1997; Benner *et al.*, 1997), la segunda de las cuales presenta funciones biológicas añadidas respecto a la primera, al igual que sucede con las ribotoxinas (D'Alessio *et al.*, 1991). El análisis evolutivo entre las dos familias ha permitido identificar, mediante ingeniería de proteínas, los determinantes responsables de estas diferencias estructurales y funcionales, si bien se ha detectado la presencia de mutaciones que no se manifiestan funcionalmente de forma inmediata y la existencia de genes duplicados que no se expresan (Ciglic *et al.*, 1998; Opitz *et al.*, 1998).

De igual modo, el estudio de la evolución de las ribotoxinas resulta de particular interés, pues parecen encontrarse en el cruce de caminos de diferentes patrones evolutivos (Martínez-Ruiz, 2000). La identificación de un intermedio evolutivo entre las ribonucleasas extracelulares fúngicas no tóxicas y las ribotoxinas podría arrojar luz sobre la evolución de esta familia de proteínas, a la vez que permitiría identificar los elementos estructurales que determinan su actividad citotóxica y su función biológica. Un posible candidato a ser dicho intermedio es la hirsutelina A de *Hirsutella thompsonii* (Martínez-Ruiz *et al.*, 1999b).

El hongo *Hirsutella thompsonii*

En 1924 se encontró un hongo no identificado parasitando el ácaro de la herrumbre del cítrico, *Phyllocoptruta oleivora* (Spears y Yothers, 1924). Décadas más tarde, tras confirmarse su presencia en el mencionado ácaro, el hongo fue descrito como *Hirsutella thompsonii* (Fisher *et al.*, 1949; Fisher, 1950) y pronto fue encontrado parasitando otras especies, como el ácaro del brote de arándano, *Aceria vaccinii* (Muma *et al.*, 1961; Baker y Neunzig, 1968; McCoy y Selhime, 1977). En ambos casos, el hongo producía decoloración y letargia del huésped, en el que se observaba la aparición de cuerpos globulares amarillos (Burditt *et al.*, 1962; Baker y Neunzig, 1968). Más tarde, a medida que se aclaraba el cuerpo del ácaro, se hacían visibles las hifas del hongo, inicialmente como cuerpos ovales y finalmente como cadenas que finalmente protruían al exterior extendiéndose principalmente desde los apéndices, aunque también podían hacerlo a través de la pared corporal y de los orificios anal y genital (*Figuras 10 y 11*) (Baker y Neunzig, 1968; Samson *et al.*, 1980).

El aislamiento de *Hirsutella thompsonii* en medio artificial (McCoy y Kanavel, 1969) permitió confirmar su carácter patógeno sobre distintas especies de ácaros que parasitaban los cítricos y otras plantas de la mayoría de regiones tropicales y subtropicales (Samson *et al.*, 1980), llegando incluso a desarrollarse

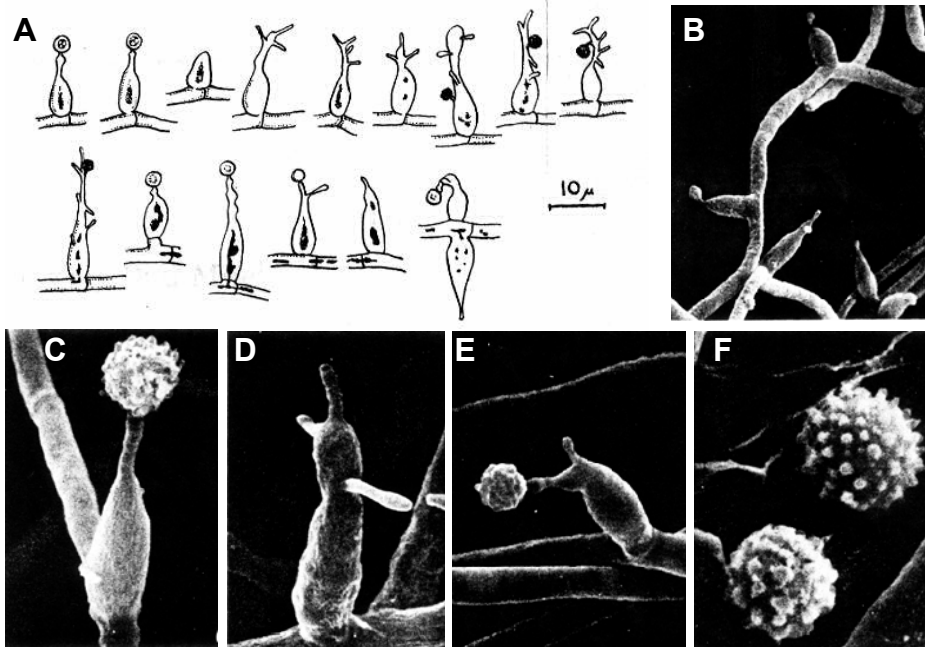


Figura 10: **A:** Conidióforos de *H. thompsonii*. Los dos conidióforos de la parte superior izquierda son típicos. También se encuentran conidióforos con cuellos adicionales (de 1 a 7) y/o con el conidio oscurecido (Baker y Neunzig, 1968). **B:** Fiálides en hifas de *H. thompsonii*. **C:** Fiálide con conidio verrugoso. **D y E:** Fiálides con dos o tres cuellos. **F:** Conidios verrugosos (Samson *et al.*, 1980).

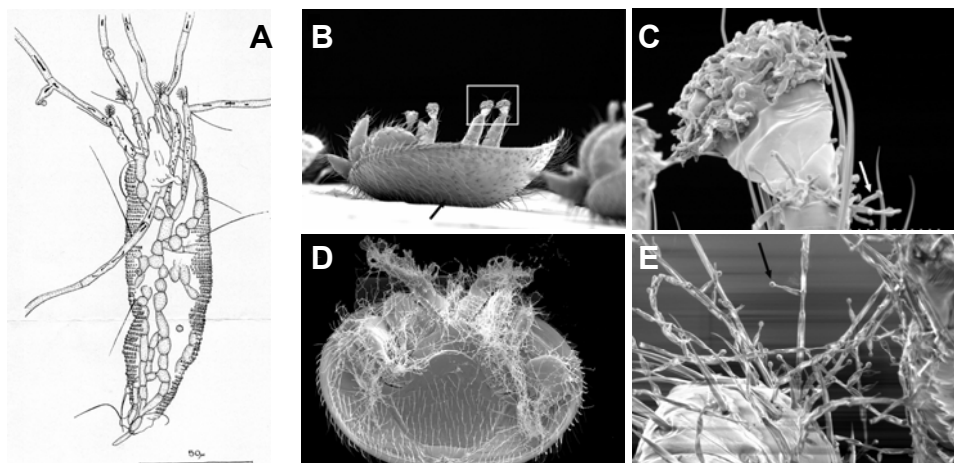


Figura 11: **A:** Ácaro del brote de arándano (*Aceria vaccinii*) infectado por *Hirsutella thompsonii*. Las hifas llenan el abdomen y protruyen a partir de las extremidades y los orificios anal y genital (Baker y Neunzig, 1968). **B:** Miosis inducida por *H. thompsonii* en un ejemplar del ácaro *Varroa destructor*, parásito de la abeja de la miel. El ácaro aparece muerto a las 72 h tras contacto con el cultivo fúngico. **C:** Detalle del micelio en el orificio succionador de las extremidades. **D:** Cadáver del ácaro cubierto por masa de micelio (ampliado en **E**) (Peng *et al.*, 2002).

a partir de él un acaricida microbiano contra determinadas especies causantes de pestes en Florida (McCoy y Couch, 1982). Más tarde se demostró que filtrados de cultivos de este hongo poseían propiedades tóxicas contra las larvas de *Galleria mellonella* (por inyección) y los individuos adultos de *Drosophila melanogaster* (por administración oral), además de exhibir toxicidad *in vitro* frente a *Bombyx mori*, conocido popularmente como “gusano de la seda” (Vey *et al.*, 1993). Todos estos resultados impulsaron la búsqueda de los posibles metabolitos tóxicos responsables de tal actividad insecticida.

Recientemente se ha descrito la acción acaricida de *H. thompsonii* sobre otras especies que parasitan distintos cultivos y plantas (Ozman y Goolsby, 2005; Rossi-Zalaf y Alves, 2006). También actúa sobre ácaros que parasitan insectos, como abejas o arañas, sin ser letal para estos, con lo que se plantea como posible agente protector para la abeja de la miel, entre otros (Kanga *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2002; Rosas-Acevedo *et al.*, 2003).

La hirsutelina como posible intermedio evolutivo

En 1995 la búsqueda de las toxinas de *Hirsutella thompsonii* culminó con el aislamiento de una proteína extracelular de 12 a 16 KDa y punto isoeléctrico superior a 10 a la que se dio el nombre de hirsutelina A (HtA), a fin de distinguirla de otras supuestas toxinas relacionadas que esperaban encontrarse en el mismo hongo (Liu *et al.*, 1995; Mazet y Vey, 1995). La biosíntesis de la toxina hasta llegar a la fase estacionaria se asoció a crecimiento celular (competencia) y no a estrés o lisis (Liu *et al.*, 1995).

La caracterización preliminar de la HtA permitió certificar su carácter monomérico, con una alta proporción de residuos básicos, ausencia de glicosilación y la presencia en su estructura de puentes disulfuro (Mazet y Vey, 1995), así como a la confirmación de su toxicidad sobre varias especies de insectos (Liu *et al.*, 1995; Mazet y Vey, 1995), ácaros (Omoto y McCoy, 1998) y líneas celulares eucariotas (Liu *et al.*, 1996). En este último caso, la HtA suprimía el crecimiento de células de insecto a concentraciones inferiores a 0'5µM, pero no afectaba a células de ratón BALB-C ni de riñón de mono verde por encima de 5µM (Liu *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1996). A tales concentraciones tampoco se observaba efecto alguno sobre *Candida albicans* o *Escherichia coli*, lo que llevó a sugerir que su acción fuera específica de invertebrados (Liu *et al.*, 1996), sobre los cuales su efecto iba desde la letalidad hasta la pérdida de fecundidad o inhibición de la deposición de los huevos (Liu *et al.*, 1996; Omoto y McCoy, 1998; Rosas-Acevedo *et al.*, 2003).

El análisis enzimático no permitió detectar inicialmente ninguna actividad (Mazet y Vey, 1995) hasta que se comprobó que el RNA ribosomal extraído de células de insecto Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) tratadas con HtA

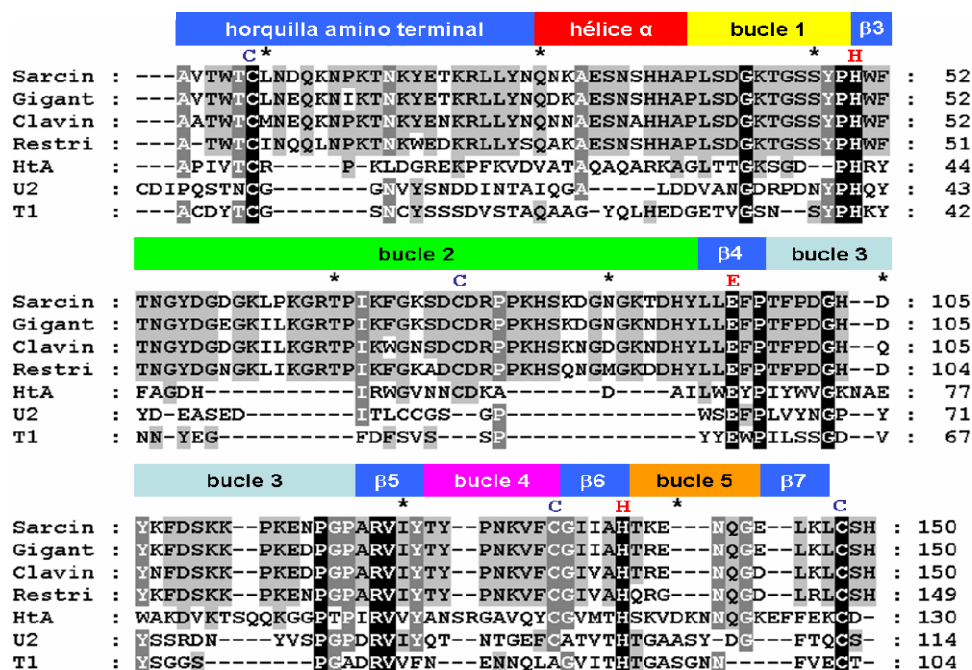


Figura 12: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de α -sarcina, gigantina, clavina, restrictocina, hirsutelina y las RNasas T1 y U2. En negro y gris aparecen los residuos conservados en las siete o al menos cuatro secuencias, respectivamente. Las barras coloreadas sobre el alineamiento acotan los diferentes fragmentos de estructura tridimensional para el caso de la α -sarcina, coincidiendo el código de colores con el empleado en las Figuras 2 y 3. También se señalan sobre la secuencia las posiciones de las cuatro cisteínas (en azul) y de los residuos catalíticos (en rojo).

presentaba una banda adicional de unos 528pb respecto al obtenido a partir de células sin tratar. Asimismo, la HtA inhibía la síntesis de proteínas en diferentes sistemas *in vitro* e impedía la replicación del virus NPV (*Nuclear Polyhedrosis Virus*) en algunos insectos, lo que la convertía en la primera micotoxina de un hongo entomopatógeno para la que se describía capacidad inhibidora de los ribosomas (Liu *et al.*, 1996). Estos resultados hicieron que la HtA fuera inmediatamente comparada con las ribotoxinas fúngicas conocidas, no encontrándose inicialmente homología con ellas en el extremo aminoterminal ni reactividad alguna con anticuerpos policlonales antirrestrictocina (Liu *et al.*, 1996). Tampoco tras la obtención de su cDNA se observaron semejanzas significativas con ellas ni con ninguna otra proteína conocida (Boucias *et al.*, 1998).

Sin embargo, un análisis más pormenorizado de la secuencia de aminoácidos deducida a partir del cDNA de la HtA y su alineamiento con las secuencias de las ribotoxinas más representativas (α -sarcina, gigantina, clavina y restrictocina) y otras RNasas fúngicas (T1 y U2) permitió encontrar un 25% de

identidad de secuencia, incluyendo las cuatro cisteínas, la supuesta tríada de residuos catalíticos (His 42, Glu 66, His 113) y las cinco hebras de la potencial lámina β principal presente en todas las proteínas de la superfamilia (*Figura 12*) (Martínez-Ruiz *et al.*, 1999b). No obstante, si se considera la secuencia completa, las diferencias de la HtA con las ribotoxinas son grandes en comparación con las existentes entre los miembros de esta familia. La HtA es 20 aminoácidos más corta y exhibe importantes diferencias en los bucles añadidos a la estructura general de las RNasas microbianas extracelulares, en los que también es diferente a las RNasas inespecíficas (T1 y U2).

Todo ello ha conducido a que recientemente se haya sugerido la posibilidad de que la HtA sea un intermedio en la evolución de estas proteínas, ya que cabe pensar que existan especies intermedias que hayan adquirido sólo algunas de las regiones que han proporcionado actividades añadidas a las ribotoxinas (Martínez-Ruiz, 2000). La confirmación o refutación de esta hipótesis requiere estudios comparativos más detallados entre la HtA y las ribotoxinas, en lo que se refiere tanto a los aspectos estructurales como a los funcionales.

OBJETIVOS

Después de todo lo hasta aquí expuesto, al comienzo del presente trabajo se plantearon los objetivos siguientes en el estudio de la hirsutelina:

1. Aislamiento y purificación de la proteína del hongo *Hirsutella thompsonii*. Partiendo de una cepa del hongo *Hirsutella thompsonii*, se tratará de desarrollar un procedimiento que permita obtener la HtA con un rendimiento y grado de pureza adecuados para abordar posteriores estudios.

2. Desarrollo de un sistema de producción de hirsutelina recombinante. Se necesitará disponer de un sistema de producción de HtA recombinante para estar en disposición de diseñar en un futuro mutantes y quimeras.

3. Caracterización estructural y funcional de las proteínas obtenidas. Se realizarán estudios estructurales de la proteína en sus variantes fúngica y recombinante, haciendo uso de diferentes técnicas. Asimismo, se procederá a caracterizar su supuesta actividad ribonucleolítica poniendo a punto diferentes ensayos en los que se analice su efecto sobre distintos sustratos y células, y a estudiar su posible interacción con membranas mediante el empleo de vesículas lipídicas como modelo.

4. Obtención y caracterización de mutantes. Se diseñarán diferentes formas mutantes de la HtA, a través de cuyo estudio se puedan extraer conclusiones acerca de los residuos implicados en el centro activo y otras regiones de interés.

5. Comparación con las ribonucleasas no tóxicas y ribotoxinas conocidas. Finalmente, se procederá al estudio comparativo de la hirsutelina y sus mutantes con las ribonucleasas no tóxicas y ribotoxinas conocidas para, de esta manera, determinar el papel funcional y estructural de las distintas regiones que diferencian a todas las ribonucleasas e inferir relaciones estructura-función en la familia de las ribotoxinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Microorganismos

1.1. Cepa de *Hirsutella thompsonii*. La cepa del hongo *Hirsutella thompsonii* Fisher var. *thompsonii* (HTF72 [CBS 556.77B]), a partir de la cual se obtuvo la proteína objeto de estudio, fue adquirida del *Centraalbureau Voor Schimmelcultures* (3740 AG Baarn, Holanda).

1.2. Cepas de *Escherichia coli*. Se emplearon diferentes cepas en función del fin perseguido, según fuera este la amplificación y purificación de plásmidos, la expresión y purificación de proteínas, o la clonación de fragmentos de PCR.

DH5 α F': {F' *endA1 hsdR17* ($r_K m_K$) *supE44 thi-1 recA1 gyrA* (NaI^R) *relA1* $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 *deoR* [Φ 80 *dlac* $\Delta(lacZ)$ M15]}. Esta cepa se utiliza comúnmente para la amplificación y propagación de plásmidos, así como para su aislamiento y posterior secuenciación automática. El genotipo *endA1* facilita la purificación del plásmido. El genotipo F' indica la presencia en el citoplasma del factor F o factor de fertilidad, en el que radica la capacidad de transferir DNA por conjugación. El factor F es un elemento pequeño de DNA circular que funciona como un minicromosoma con alrededor de cien genes, que le confieren capacidad para replicar su DNA de forma independiente y codificar para el *pili* bacteriano.

BL21 (DE3): {F⁻ *ompT* [*lon*] *hsd_B* (*r_B* *m_B*; cepa tipo B de *E. coli*)}. Con DE3, profago λ que contiene el gen de la RNA polimerasa de T7 regulado por el promotor lacUV5, inducible por IPTG. Se decidió hacer uso de esta cepa conociendo su buena condición para la expresión de genes plasmídicos. Estas células fueron hechas competentes por el método del CaCl₂.

BL21 (DE3) pT-Trx: iguales a las anteriores pero con el plásmido pT-Trx, que les confiere la capacidad de expresar el gen de la tiorredoxina. Estas células fueron cedidas por el Dr. Ishii (*Laboratory of Molecular Genetics, RIKEN, Tsukuba Life Science Center, Japón.*).

BL21 (DE3) codon plus: células comerciales que incorporan los tRNA preferidos por la proteína que se desea expresar y que no se encuentran entre los más abundantes en *E. coli* (AGA, AGG, CCC, en el caso de la HtA).

HB101: {F⁻ Δ (*gpt-proA*)62 *leuB6 supE44 ara-14galK2 lacY1* Δ (*mcrC-mrr*) *rpsL20* (Str^r) *xyl-5 mtl-1 recA13*}.

RB791: {W3110 *lacI^q* L8}.

BW313: {*HfrKL16 po/45* [*lysA* (61-62)] *dut1 ung1 thi1 relA1*}. Esta cepa tiene muy baja tasa de mutación espontánea y es sensible a la infección con fagos filamentosos pequeños. Además permite la incorporación de uridina al DNA, debido al genotipo *dut1, ung1*.

TOP10 One Shot[®] Chemically Competent Cells (Invitrogen): {F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*}. Empleadas para la transformación tras subclonación de fragmentos de PCR en el vector pCR[®]-Blunt II-TOPO[®], según lo descrito en el kit Zero Blunt TOPO de Invitrogen.

1.3. Líneas celulares de mamífero. Las líneas celulares de mamífero utilizadas para los ensayos de citotoxicidad fueron cedidas amablemente por la Dra. María Antonia Lizarbe.

RD: esta línea celular proviene de células de rhabdomiosarcoma humano (ATCC CCL 136). Se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con suero fetal bovino al 5%, glutamina 300µg/ml, penicilina 50 IU/ml y estreptomicina 50µg/ml. La incubación se realizó a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. La recogida y propagación de estas células se llevó a cabo de forma rutinaria por tripsinización (Turnay *et al.*, 1993).

Fibroblastos humanos: células cultivadas, recogidas y propagadas de forma similar a la ya descrita para las células de rhabdomiosarcoma.

1.4. Líneas celulares de insecto. Las dos líneas celulares de insecto empleadas se cultivaron en monocapa a 27°C, utilizando el medio Insect X-Press (BioWhittaker) con gentamicina 50µg/ml.

Sf9: esta línea deriva de las células IPLB-Sf21-AE de *Spodoptera frugiperda*. Las células Sf9 se adaptan al cultivo en suspensión en medio Insect X-Press, aunque también pueden ser utilizadas en un cultivo en monocapa. Su tiempo de duplicación en este medio varía de 18 a 30 horas hasta una densidad máxima de 8 a 12 x 10⁶ células/ml. Pueden ser criopreservadas.

High Five: las células High Five (BTI-TN-5B1-4) derivan de la línea celular parental de *Trichoplusia ni*. Al igual que las Sf9, pueden crecer en medio Insect X-Press libre de proteínas en cultivos en monocapa, pero su crecimiento y mantenimiento no es tan eficiente en cultivos en suspensión.

2. Medios de cultivo

Todos los medios descritos a continuación, a excepción del medio Insect X-Press, se utilizaron tras esterilización por autoclavado, en un ciclo de 20 minutos a 120°C. La glucosa se esterilizó por filtración a través de filtros estériles de 0.2µm de tamaño de poro. En los casos en los que fue necesario añadir un antibiótico, este se esterilizó igualmente por filtración.

PDY (Potato Dextrose Yeast). Utilizado para cultivo del hongo *Hirsutella thompsonii* en medio líquido (para producción de proteína). Contiene 26g/l de caldo de dextrosa y patata y 5g/l de extracto de levadura.

PDA (Potato Dextrose Agar). Utilizado para conservación en placa de la cepa de *Hirsutella thompsonii*. Formado por 26g/l de caldo de dextrosa y patata y 15g/l de agar.

LB (Luria-Bertani) (Sambrook *et al.*, 1989). Se utilizó como medio general para el crecimiento de *E. coli*, tanto para la conservación de colonias (cultivo en placa) como para la expresión de proteína (cultivo en medio líquido). Contiene 10g/l de triptona bacteriológica, 5g/l de extracto de levadura y 10g/l de NaCl, a pH 7.0. Para prepararlo como medio sólido para los cultivos en placa se añadieron 15g/l de agar. La variante **LB soso** se prepara con NaCl a 5g/l. Para la

selección de transformantes de *E. coli* resistentes a algún antibiótico, se añadió este a la concentración estándar recomendada (Sambrook *et al.*, 1989).

Ψ Broth. Utilizado para la obtención de células competentes de *E. coli* y su posterior transformación con DNA plasmídico. Contiene triptona bacteriológica 2% (p/v), extracto de levadura 0'5% (p/v), MgSO₄ 0'4% (p/v) y KCl 10mM. El pH del medio es de 7'6.

Medio Mínimo (Sambrook *et al.*, 1989). Utilizado para el crecimiento de *E. coli* cuando se desea marcar la proteína producida con ¹⁵N y/o ¹³C. Contiene 100ml/l de mezcla de sales M9 10x (60g/l de Na₂HPO₄, 30g/l de KH₂PO₄, 5g/l de NaCl y 10g/l de NH₄Cl a pH 7'4), CaCl₂ 0'1mM, MgSO₄ 1mM y glucosa al 0'2% (p/v). El marcaje isotópico se introdujo a través de ¹⁵NH₄Cl y ¹³C-glucosa.

YT (Sambrook *et al.*, 1989). Se utilizó para el crecimiento de cepas de *E. coli* destinadas a la obtención de ssDNA. Es un medio más rico que el LB y contiene 16g/l de triptona bacteriológica, 10g/l de extracto de levadura y 5g/l de NaCl; finalmente se suplementa, tras autoclavar, con 2g/l de glucosa esterilizada por filtración. La variante **YT-soft agar**, se diferencia únicamente en que lleva 6g/l de agar en lugar de los 15g/l habituales cuando se prepara como medio sólido.

Insect X-Press (BioWhittaker). Este medio está enriquecido con L-glutamina y carece de proteínas. Se utiliza para el crecimiento y mantenimiento de células de *Spodoptera frugiperda* (SF9) y *Trichoplusia ni* (Tni High Five). Permite el cultivo celular tanto en suspensión como en monocapa.

3. Oligonucleótidos

3.2. Oligonucleótidos empleados para clonación. Los oligonucleótidos HtA6 y HtA7 fueron encargados a Sigma-Genosys e hibridan con los extremos del gen de la HtA, incorporando a los mismos las dianas NdeI y EcoRI. También se emplearon para la secuenciación del plásmido pTacTacHtA y sus mutantes (ver apartado de Métodos).

HtA 6: 5'-GAA TTC ACT CTA ATC GCA CTT CTC AAA G-3'.

HtA 7: 5'-GTG ACA CCA TAT GGC TCC CAT CGT CAC CTG CCG GCC CA-3'.

3.2. Oligonucleótidos mutagénicos. Todos los oligonucleótidos destinados a introducir mutaciones en el gen de la HtA fueron encargados a Sigma-Genosys. Para la nomenclatura de cada uno de ellos se emplearon un número, que hace referencia a su orden de almacenamiento, y adicionalmente una letra, A, B, C o D, en los utilizados para mutagénesis por extensión del solapamiento, de acuerdo al esquema que se recoge en el apartado de Métodos para tal procedimiento. Las mutaciones introducidas con respecto a la secuencia de la HtA se destacan en negrita y subrayadas.

HtA 9: 5'-TAC TGC GGC GTC ATG ACG CAA A AGC AAG GTC GAC AAG-3'.

HtA 10: 5'-TC GAC CTT GCT TTG CGT CAT GAC -3'.

Estos oligonucleótidos (HtA 9 y HtA 10) se utilizan para generar la mutación H113Q por el método de Kunkel.

HtA 11A: 5'-ATC ATC ACC ATA TGG CTC CCA TCG TCA CCT GCC GGC CCA-3'.

HtA 12B: 5'-CGG CGT CAT GAC GCA AAG CAA GGT CGA CAA G-3'.

HtA 13C: 5'-CTT GTC GAC CTT GCT TTG CGT CAT GAC GCC G-3'.

HtA 14D: 5'-AAG CAG GAA TTC ACT CTA ATC GCA CTT CTC AAA G-3'.

Los oligonucleótidos 11A y 14D hibridan con los extremos del gen de la HtA y las zonas inmediatamente adyacentes del plásmido que lo contiene. Los oligonucleótidos 12B y 13C introducen la mutación H113Q.

HtA 15B: 5'-AAG AGC GGC GAC CCT CAA A CGG TAC TTC GCC GGC-3'.

HtA 16C: 5'-GCC GGC GAA GTA CCG TTG AGG GTC GCC GCT CTT-3'.

Se utilizan los oligonucleótidos 15B y 16C para generar la mutación H42Q.

HtA 17B: 5'-GAC GCG ATC CTG TGG CAG TAC CCG ATC TAC TGG-3'.

HtA 18C: 5'-CCA GTA GAT CGG GTA CTG CCA CAG GAT CGC GTC-3'.

Los oligonucleótidos 17B y 18C introducen la mutación E66Q en el gen HtA.

HtA 19A: 5'-CAC CAT CAC CAT ATG GCT CCC ATC GTA ACA TGTT CGG CCC AAG CTC GAC GGG CGG-3'.

HtA 20A: 5'-CAC CAT CAC CAT ATG GCA CCA ATC GTA ACA TGTT CGG CCC AAG CTC GAC GGG CGG-3'.

Estos oligonucleótidos (19A y 20A) introducen mutaciones en el sitio de unión del ribosoma (RBS, *Ribosome Binding Site*), dando lugar a los mutantes RBS y RBS', para tratar de mejorar la expresión del gen de la HtA.

HtA 21B: 5'-GCG GAC GCG ATC CTG TTT GAG TAC CCG ATC TAC-3'.

HtA 22C: 5'-GTA GAT CGG GTA CTC AAA CAG GAT CGC GTC CGC-3'.

Se utilizan los oligonucleótidos 21B y 22C para generar la mutación W65F.

HtA 23B: 5'-GAG TAC CCG ATC TAC TTT GTC GGC AAG AAC GCC-3'.

HtA 24C: 5'-GGC GTT CTT GCC GAC AAA GTA GAT CGG GTA CTC-3'.

Los oligonucleótidos 23B y 24C introducen la mutación W71F en el gen HtA.

HtA 25B: 5'-GGC AAG AAC GCC GAG TTT GCC AAG GAC GTC AAG-3'.

HtA 26C: 5'-CTT GAC GTC CTT GGC AAA CTC GGC GTT CTT GCC-3'.

Estos oligonucleótidos (25B y 26C) se utilizan para generar la mutación W78F.

3.3. Oligonucleótidos para la síntesis de SRL. PSRL y PT7 se utilizaron para la síntesis *in vitro* de un oligonucleótido con la secuencia del lazo sarcina/ricina.

PSRL: 5'-GGG AAT CCT GCT CAG TAC GAG AGG AAC AGA AGG TT-3'.

PT7: 5'-TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG-3'.

4. Vectores plasmídicos

pCWori-SR (Muchmore *et al.*, 1989; Cook *et al.*, 2002). El vector pCWori se caracteriza por incluir dos fragmentos tac adyacentes al promotor lacUV5, lo que constituye un potente promotor que permite la expresión constante de proteína, resultando óptimo para una producción continua y en gran cantidad. Lleva incluido como inserto el gen de la serina racemasa (1030pb) entre los sitios de restricción NdeI y XbaI, y se utiliza para la expresión de esta proteína de modo inducible por IPTG. Se utilizó este plásmido para la construcción a partir de él del vector pTacTacHtA (ver apartado de Métodos).

pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]. Este vector (~3'5Kb), perteneciente al kit comercial Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen), se utilizó para la subclonación de fragmentos de PCR con extremos romos. Su empleo facilita la selección de recombinantes porque incluye el gen letal *ccdB*, cuya expresión queda anulada tras la adecuada incorporación del inserto deseado, además de presentar genes de resistencia a zeocina y kanamicina.

5. Lípidos y sondas fluorescentes

5.1. Lípidos. Todos los lípidos empleados fueron adquiridos por medio de la casa comercial Avanti Polar Lipids, excepto el PG de huevo, que se encargó a Sigma.

DMPC: 1,2-Dimiristoil-*sn*-glicero-3-[fosfocolina].

DMPG: 1,2-Dimiristoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)].

DMPS: 1,2-Dimiristoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-L-serina].

PG: 1,2-Diacil-*sn*-glicero-3-fosfo-[1-rac-glicerol] de yema de huevo.

5.2. Sondas fluorescentes. Para los ensayos de pérdida de contenidos acuosos se emplearon las siguientes sondas fluorescentes hidrofílicas, encargadas a Molecular Probes:

ANTS: ácido 1-aminonaftalen-3,6,8-trisulfónico.

DPX: bromuro de N,N'-p-xililen-bis-piridinio. Utilizado como desactivador del ANTS.

6. Tampones y soluciones de uso general

6.1. Antibióticos. Todos los antibióticos empleados se preparan en H₂O milli-Q y se esterilizan por filtración a través de filtros de 0'2µm de tamaño de poro.

Ampicilina: se utiliza a una concentración final de 50 ó 100µg/ml.

Zeocina: se utiliza a una concentración final de 25µg/ml. Debe evitarse su exposición a la luz para impedir su degradación.

6.2. Electroforesis de ácidos nucleicos.

Tampón de aplicación 6x (electroforesis de DNA): azul de bromofenol 0'25% (p/v), cianol de xileno 0'25% (p/v) y glicerol 30% (v/v).

TAE 1x (tampón Tris-Acetato-EDTA): Tris-acetato 0'04M (484g/l de base Tris y 1'14ml/l de ácido acético glacial), EDTA 1mM.

6.3. Electroforesis de proteínas.

Tampón de aplicación 1x: Tris-HCl 50 mM pH 7'6, EDTA 2 mM, SDS 1% (p/v), glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0'02% (p/v). Cuando se quisieron reducir las muestras, se añadió 2-mercaptoetanol al 5% (v/v).

Tampón de desarrollo: Tris-HCl 25mM, glicocola 0'2M y SDS 0'1% (v/v).

Azul de Coomassie: Azul de Coomassie R-250 0'26% (p/v), metanol absoluto 45'4% (v/v) y ácido acético glacial 9'2% (v/v) en H₂O.

Solución de desteñido: metanol absoluto 20% (v/v) y ácido acético glacial 7'5% (v/v) en H₂O.

6.4. Preparación de células competentes. Los tampones Tfb1 y Tfb2 se conservan a 4°C.

Tfb1: RbCl 100mM, MnCl₂ 50mM, KAcO 30mM, CaCl₂A2H₂O 10mM, glicerol 15% (v/v), pH 5'8. Se esteriliza por filtración.

Tfb2: MOPS 10mM, RbCl 10mM, CaCl₂AH₂O 75mM, glicerol 15% (v/v), pH 7'0 (se ajusta con NaOH). Se esteriliza mediante autoclavado.

6.5. Inmunodetección por el método *Western Blot*.

Solución de revelado: Tetrahydroclorato de 3,3'-diaminobencimidina (DAB) 0'03% (p/v) y H₂O₂ 0'016% (v/v) en 50ml de tampón PBS.

Tampón de transferencia: Tris 48mM, Gly 39mM, SDS 0'0375% (p/v) y metanol 20% (v/v).

6.6. Otras soluciones.

IPTG (100mM) (isopropiltio-β-D-galactósido): se prepara en H₂O milli-Q y se esteriliza por filtración a través de filtros de 0'2μm de tamaño de poro.

Mezcla de sales M9 10x: 60g/l de Na₂HPO₄, 30g/l de KH₂PO₄, 5g/l de NaCl y 10g/l de NH₄Cl a pH 7'4.

PBS (tampón fosfato salino): NaCl 0'14M, KCl 2'7mM, KH₂PO₄ 1'5mM, Na₂HPO₄ 8'1mM, pH 7'4.

Tampón de sonicación: Tris 100mM, Tween 1%, NaCl 0'3M, pH 7'8.

TBE 1x: Tris-borato 0'045M (10'8g/l de base Tris y 5'5g/l de ácido bórico), EDTA 1mM.

TE (tampón Tris-EDTA): Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7'4 - 8'0.

MÉTODOS

1. Conservación de cepas

1.1. Cepa de *Hirsutella thompsonii*. La cepa del hongo *Hirsutella thompsonii* se conservó mediante cultivos en agar en tubos inclinados cubiertos con aceite de vaselina a temperatura ambiente.

1.2. Cepas de *Escherichia coli*. Las cepas de *E. coli* se conservaron congeladas a -80°C , en presencia de glicerol aproximadamente al 33% (v/v). Para ello, a 1ml de cultivo en medio líquido (por lo general LB) crecido durante una noche con presión de selección, se le añadieron 0'5ml de glicerol al 80% (v/v). Para volver a crecer las células, se siembran en una placa de LB-agar con presión de selección.

2. Manipulación de cepas de *E. coli*

2.1. Preparación de células competentes. Las células de *E. coli* se hicieron competentes siguiendo básicamente el método descrito por Hanahan (1983), con una modificación que implica el empleo de RbCl, según recomendaciones del Dr. José Luis García López, del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Para ello, células de *E. coli* sembradas recientemente en placa Petri se inocularon en 5ml de Ψ Broth y se incubaron a 37°C con fuerte agitación hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600}) de 0'3. Una vez alcanzada esta, se inocularon en 100ml de Ψ Broth y se incubaron hasta que la DO_{600} fue 0'48. El crecimiento del cultivo se detuvo en hielo y las células se sedimentaron por centrifugación en frío a 2500g, se resuspendió el sedimento en 30ml de Tfb1 frío, y se mantuvieron en hielo durante 90 minutos. Las células se sedimentaron de nuevo, en las mismas condiciones que la vez anterior, pero en esta ocasión se resuspendieron en 4ml de Tfb2 frío. Las células competentes obtenidas se distribuyeron en alícuotas de 0'2 ml y se congelaron a -80°C .

2.2. Transformación de células y selección de recombinantes. Se descongelaron células competentes preparadas por el método del RbCl de la estirpe adecuada y se mantuvieron en hielo durante 10 minutos. A continuación se añadió el DNA en un volumen lo más pequeño posible (siempre menor de 50 μl) en cantidad de 1 a 100ng y se mantuvieron 15 minutos en hielo. La entrada del DNA plasmídico al interior de las células se favoreció mediante un choque térmico por incubación en baño de agua a 37°C durante 4 minutos y posterior enfriamiento en hielo durante 2 minutos. Se añadieron 4 volúmenes de ψ Broth y se incubó la mezcla a 37°C durante 1 hora, de nuevo en baño de agua y con

agitación suave. Este paso permite la recuperación de la integridad de la membrana y la expresión del gen selector de resistencia al antibiótico. Finalmente, se centrifugó a 5000g durante 5 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en la cantidad adecuada de medio (100-200µl), para sembrarlas en placa de LB-agar con el antibiótico correspondiente e incubar en una estufa a 37°C hasta la aparición de colonias (una noche). De este modo, sólo las células que hubieran incorporado correctamente el plásmido y expresaran el gen de resistencia podrían crecer en la placa.

Alternativamente, en el caso de células competentes comerciales, se extrajo una alícuota, se dejó descongelar a temperatura ambiente durante unos cuatro minutos y se mantuvo en hielo durante 10 minutos. Se añadió el DNA plasmídico o la mezcla de ligación con los que se deseaba transformar (1-10ng de DNA) y se mantuvieron las células durante otros 30 minutos en hielo. La entrada del DNA al interior de las células se facilitó mediante un choque térmico por incubación a 37°C, durante 30 segundos, y enfriamiento posterior en hielo durante 2 minutos. Se añadieron 950µl de LB a temperatura ambiente y se incubaron las células durante una hora a 37°C en incubador con agitación constante (250rpm), para permitir la recuperación de la integridad de la membrana y la expresión de los vectores. Por último, se sembraron diferentes volúmenes en placas de LB con el/los antibiótico/s correspondiente/s, y se incubaron las placas a 37°C hasta la aparición de colonias. En el caso de células TOP10 *One Shot*[®] se siguieron las instrucciones del kit Zero Blunt TOPO de Invitrogen, utilizando zeocina como presión de selección.

2.3. Selección de colonias por tamaño de plásmido. Las colonias obtenidas de una transformación se sembraron en placas de LB-agar con el antibiótico correspondiente para obtener más masa celular. Parte de estas colonias se recogieron con un asa de siembra y se lisaron en 40µl de tampón de lisis. La mezcla se neutralizó con 3µl de HCl 1N y se añadieron 5µl de tampón de aplicación 6x. La mezcla se congeló a -80°C durante 15 minutos, de manera que el SDS arrastrara el DNA cromosómico al precipitar. Mediante centrifugación a 4°C durante 10 minutos se sedimentó el SDS y la mayoría del DNA cromosómico, así como los restos celulares. El sobrenadante que contenía el DNA plasmídico se analizó por electroforesis en geles de agarosa, distinguiéndose los plásmidos sin inserto de los que lo hubiesen incorporado por su diferente movilidad electroforética. En todos los casos se incluyeron marcadores de masa molecular y plásmidos control para poder discriminar entre las colonias positivas y las negativas.

3. Manipulación de DNA

3.1. Electroforesis en geles de agarosa. Los geles de agarosa se prepararon al 0'7-1% (p/v) en TAE 1x, dependiendo del tamaño del DNA que se quería detectar o purificar. Las electroforesis se desarrollaron a 80-100V con voltaje constante. En todos los casos se utilizaron como patrones de masa molecular escaleras de 100pb o de 1Kb (Gibco), o bien plásmidos digeridos o sin digerir de tamaño y concentración conocidos. Las muestras se aplicaron en tampón de aplicación 6x. Una vez finalizado el proceso electroforético se detectó el DNA por tinción con bromuro de etidio (1µg/ml), observándose las bandas bajo luz ultravioleta en un equipo UVI-Tec. También se utilizaron geles de agarosa con bajo punto de fusión (*low melt*) para la purificación de fragmentos pequeños de DNA (100-800 pb) o de productos de amplificación por PCR. El desarrollo de estas electroforesis se realizó a 4°C y a 80V.

3.2. Aislamiento y purificación de plásmidos de *E. coli*. El DNA plasmídico se aisló con el método comercial de Promega Wizard minipreps. Para ello, se inocularon 5ml de medio LB con el antibiótico correspondiente con una colonia aislada del clon de bacterias transformadas de interés. El cultivo se creció a 37°C durante 16 horas, transcurridas las cuales se congeló una alícuota de 1ml de células a -80°C. A continuación, las células se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron en Tris-HCl 50mM, pH 7'5, EDTA 10mM, con RNasa A 100µg/ml. Posteriormente, se lisaron con NaOH 0'2M, SDS 1%. El pH de la muestra se neutralizó con acetato potásico 1'32M, y los restos celulares se eliminaron por centrifugación. El sobrenadante, que contenía el DNA plasmídico, se puso en contacto con la resina del kit, que presenta afinidad por el DNA. Este DNA unido a la resina se lavó con la solución de lavado (NaCl 200mM, Tris-HCl 20mM pH 7'5, EDTA 5mM) diluida 1:1 en etanol 95%, y se eluyó a continuación con de agua. El DNA plasmídico así purificado se analizó por electroforesis, obteniéndose con un grado de pureza suficiente para análisis de restricción y secuenciación. Una vez que estuvo suficientemente caracterizado, se procedió a su purificación a mayor escala. Para ello, se utilizó el kit de Wizard maxipreps, que consiste en un tratamiento prácticamente idéntico al descrito en las líneas anteriores, pero adaptado a 500ml de cultivo inicial de bacterias y en el que se eluye el DNA por adición de TE.

3.3. Aislamiento y purificación de fragmentos de DNA. Para la purificación de fragmentos de DNA, se prepararon geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (p/v) en TAE 1x. La purificación se realizó con el método comercial de Promega Wizard PCR Preps. Según sus instrucciones, se procedió inicialmente a fundir el bloque de agarosa que contenía la banda de interés por incubación a 70°C. Una vez completada la fusión, se añadió rápidamente la

resina suministrada en el kit y se agitó la mezcla durante unos 20 segundos. Posteriormente, se montó una pequeña columna que fue lavada con 2ml de isopropanol al 80%. La elución se llevó a cabo con 50µl de H₂O o tampón TE.

3.4. Digestiones con endonucleasas de restricción. La utilización de estas enzimas permitió la obtención de fragmentos de DNA que hicieron posible la formación de construcciones útiles para la clonación y expresión de genes de las diferentes formas, mutantes o no, de la HtA. Todas las digestiones enzimáticas del DNA se realizaron en condiciones de temperatura óptimas para cada enzima. En cada caso se utilizó una mezcla de reacción consistente en el tampón adecuado para cada enzima, RNasa A (0'5mg/ml) y albúmina de suero bovino (BSA, 1mg/ml). En los casos en los que fue necesario, la enzima fue posteriormente inactivada por calentamiento a 65°C durante 15 minutos. El rendimiento de las digestiones se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0'7-1% (p/v) en TAE 1x.

3.5. Ligación de fragmentos de DNA. La reacción de ligación de fragmentos de DNA se realizó utilizando la DNA ligasa del bacteriófago T4. La mezcla de reacción se completó con el tampón de la ligasa y se mantuvo a 20°C durante unas 15 horas. Transcurrido ese tiempo, la reacción se detuvo por calentamiento a 65°C durante 15 minutos. En el caso de las reacciones de ligación destinadas a conseguir la subclonación de fragmentos de PCR en el plásmido pCR®II-Blunt-TOPO®, se siguieron las instrucciones del kit Zero Blunt TOPO de Invitrogen, que permite conseguir la clonación de fragmentos de PCR con extremos romos en el vector mencionado en tan sólo 5 minutos.

3.6. Construcción del plásmido pTacTacHtA. Se construyó el vector pTacTacHtA (~6'1Kb), que lleva incluido el gen de la HtA y dos fragmentos tac adyacentes al promotor lacUV5, lo que permite la expresión constante de proteína de modo inducible por IPTG, convirtiéndolo en óptimo para la producción continua y en gran cantidad, sobre todo dada la naturaleza tóxica de la proteína objetivo. Además, el vector incorpora a la proteína en su extremo aminoterminal una extensión de seis histidinas, lo que facilita la posterior purificación en una columna de afinidad de Ni²⁺. La construcción se llevó a cabo por PCR, utilizando los oligonucleótidos HtA6 y HtA7, a partir del plásmido pCWori-SR (~5'5kb), que llevaba incluido como inserto el gen de la racemasa (1030pb) (Muchmore *et al.*, 1989; Cook *et al.*, 2002). Se cortó este inserto en las dianas NdeI y EcoRI y se sustituyó el fragmento eliminado por el gen de la HtA, obtenido del plásmido pSTE Blue, amablemente cedido por el Dr. Drion G. Boucias de la Universidad de Florida.

3.7. Purificación en placa de DNA de cadena simple rico en uridina.

La clonación de un fragmento de DNA en un plásmido que contenga en su secuencia un origen de replicación para un fago filamentoso permite su utilización para la obtención de DNA de cadena simple (ssDNA). Este ssDNA puede servir posteriormente de molde en los ensayos de mutagénesis dirigida por oligonucleótido, como ya se ha descrito (Messing, 1983; Merola *et al.*, 1989). Según este procedimiento, en primer lugar se transformaron células BW313 con el vector pTacTacHtA, que lleva clonado el inserto adecuado en cada caso, HtA o alguno de sus mutantes sobre el cual se desea introducir una nueva mutación. Tras la transfección con el fago F1, se producen plásmidos de cadena sencilla que son encapsidados y secretados al medio de cultivo como si fuesen partículas virales. Además, las células BW313, susceptibles a la infección con fagos filamentosos pequeños, poseen un genotipo *dut1, ung1*, que permite la incorporación estable de uridina al DNA, así como una baja tasa de mutación espontánea. Tras crecer las células transformadas en placas de YT-agar con ampicilina (0'1mg/ml) y uridina (1µg/ml), una de las colonias transformadas se inoculó en 5ml del mismo medio líquido y se incubó el cultivo una noche a 37°C con agitación. Al día siguiente se añadió el fago F1 para transfectar las células a una concentración de 8×10^9 p/ml y previamente atemperado a 37°C, ya que en este paso resulta de suma importancia mantener constante esta temperatura. Se dejó actuar durante unos segundos y se añadió al medio de transfección YT-soft agar fundido con ampicilina y uridina a las concentraciones arriba indicadas, tras lo cual se vertió todo ello sobre placas de YT-agar-ampicilina-uridina y se dejó solidificar. Las placas con las células transfectadas se incubaron durante una noche en estufa a 37°C, para permitir la replicación del vector y la secreción de la hebra no codificante del plásmido enriquecida en uridina. A la mañana siguiente podían verse pequeños halos de lisis bacteriana en las placas, síntoma de que la transfección había ocurrido correctamente. Para la extracción de los fagos y las partículas víricas de los restos celulares, se lavaron las placas con 5ml de YT-ampicilina durante 1 hora a temperatura ambiente y con ligera agitación, y se centrifugaron a continuación estos lavados a 10.000g para eliminar el sedimento celular que se arrastra de manera inevitable. Este paso de centrifugación resulta crítico, pues si en el sobrenadante quedan restos del sedimento, al final de la purificación aparecerá DNA cromosómico contaminando la muestra de ssDNA. Al sobrenadante con los fagos y las partículas víricas se le añadió 1/10 de polietilenglicol (PEG) 25% (p/v) y NaCl 2'5M, y se mantuvo dos horas a 4°C. Tras centrifugación a esta misma temperatura durante 30 minutos a 10.000g, se desechó el sobrenadante y los sedimentos se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. Tras esta nueva centrifugación, los restos de PEG presentes en el sobrenadante fueron eliminados aspirando con una punta capilar. Los sedimentos se resuspendieron en 1'3ml de TE y se repitieron los pasos desde la adición del PEG, realizando las

centrifugaciones a 12.000g en microfuga durante 15 minutos. Tras la última centrifugación, se aspiraron perfectamente los restos de PEG y el sedimento se resuspendió esta vez en 400µl de TE con RNasa A 0'5% (p/v). La muestra se extrajo con 400µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1) y la fase acuosa se lavó repetidamente con 1ml de éter etílico frío. El ssDNA contenido en esta fase acuosa se precipitó con 1/10 (v/v) de LiCl 4M, MgCl₂ 0'1M, pH 5'2, y 2'5 volúmenes de etanol frío, dejándolo durante 30 minutos a -20°C. Posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 4°C a 12.000g en microfuga. El ssDNA así precipitado se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y, una vez seco, se disolvió en 50µl de TE o H₂O. La pureza se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0'7% en TAE 1x.

3.8. Fosforilación de oligonucleótidos. Se siguió el protocolo estándar (Sambrook *et al.*, 1989), basado en la utilización de la polinucleótido quinasa (PNK) del fago T4. La reacción de fosforilación se llevó a cabo en un volumen total de 30µl, incubando 8µl del oligonucleótido mutagénico a concentración 100µM (0'1 nmol/µl) con 10 unidades de PNK en presencia de 3µl de Tris 1M pH 8'0, 3µl de MgCl₂ 0'1M, 1'5µl de DTT 0'1M, 3µl de ATP 1mM y 10'5µl de H₂O para completar el volumen necesario. La incubación se mantuvo en baño de agua a 37°C durante 45 minutos, transcurridos los cuales se inactivó la enzima por calentamiento a 65°C durante 10 minutos. Con este procedimiento se consigue fosforilar la sonda en el extremo 5', lo que permite que, una vez terminada la reacción de mutagénesis con el molde de ssDNA circular, se pueda producir la ligación de los extremos mediante la acción de la ligasa.

3.9. Mutagénesis con DNA plasmídico enriquecido en uridina. La obtención de las diferentes formas mutantes de la HtA se intentó, en un primer momento, siguiendo el método descrito por Kunkel (Kunkel *et al.*, 1987), que se basa en la utilización como molde a mutar de DNA plasmídico de cadena simple enriquecido en uridina. Según este procedimiento, la mutagénesis se lleva a cabo partiendo de oligonucleótidos sintéticos que hibridan con diferentes zonas del gen a mutar, incluido en el ssDNA-U molde, y en los cuales se han incluido las mutaciones pertinentes. En la reacción se produce en primer lugar la hibridación entre el ssDNA-U y la sonda mutagénica fosforilada; posteriormente el fragmento Klenow de la DNA polimerasa sintetiza, a partir de la sonda mutagénica que actúa como cebador, la hebra complementaria al molde de ssDNA-U. La ligasa se encarga de sellar los extremos gracias a la fosforilación del extremo 5' de la sonda mutagénica, con lo que se consigue un plásmido circular bicatenario con una de sus hebras rica en uridina (la hebra parental) y otra recién sintetizada que posee la mutación deseada. La reacción de mutagénesis se realiza mediante hibridación del ssDNA-U con el oligonucleótido mutagénico fosforilado en una relación molar 1:10 (ssDNA-U:

oligonucleótido), en un volumen final de reacción de 10µl. La mezcla se calienta 3 minutos a 90°C y se deja enfriar lentamente por debajo de los 30°C, llevándose a continuación a un baño de hielo, donde se añaden los componentes para la síntesis y ligación del DNA: 5µl de HEPES 200mM pH 7'8, 2'5µl de DTT 0'1M, 5µl de MgCl₂ 0'1M, 2µl de ATP 5mM, 2µl de mezcla de dNTPs 2'5mM cada uno, 1 unidad de DNA polimerasa Klenow y 10 unidades de la DNA ligasa del fago T4, completando con H₂O hasta 42µl. A continuación se realiza una incubación durante 5 minutos en hielo, seguida de 5 minutos a temperatura ambiente y 2 horas a 37°C, siendo estos periodos de incubación críticos para el buen desarrollo de la reacción, ya que de esta forma se facilita la acción de la DNA polimerasa Klenow y de la ligasa. La reacción se detiene por adición de 4µl de EDTA 0'5 M a pH 8'0. De este modo se consigue un plásmido circular bicatenario híbrido, con una de sus hebras (la parental) rica en uridina y la otra (la mutante de nueva creación), sin uridina. Con la mezcla mutagénica se transforman células DH5αF' (*dut*⁺, *ung*⁺), que seleccionan la hebra mutante sin uridina, y se incuban a 37°C una noche, lo que permite que durante la proliferación celular se replique sólo la hebra carente de uridina. Posteriormente se aíslan los plásmidos de las colonias obtenidas por el método de minipreps, eligiéndose los clones con la mutación adecuada mediante secuenciación automática de los plásmidos obtenidos.

3.10. Mutagénesis dirigida por extensión del solapamiento. Se requieren cuatro oligonucleótidos para introducir una mutación puntual por el método de extensión del solapamiento (Higuchi *et al.*, 1988; Ho *et al.*, 1989). Dos de ellos se emplean en una primera reacción de PCR para amplificar el DNA que contiene la base que se desea mutar junto con la secuencia adyacente en uno de los sentidos, mientras que el segundo par de oligonucleótidos participan en una etapa paralela de amplificación del fragmento que incluye de nuevo la base a mutar y la secuencia adyacente en el otro sentido (*Figura 13*). Cada uno de estos dos pares de oligonucleótidos está formado, por tanto, por una sonda que contiene la mutación perseguida y otra que simplemente hibrida con un extremo de la secuencia. Asimismo, los fragmentos de PCR resultantes de estas dos reacciones solapan, por consiguiente, en la zona que incluye la mutación. Estos dos fragmentos se utilizan posteriormente, junto con los oligonucleótidos que hibridan con los extremos de ambos, en una tercera etapa de PCR, dando como resultado la secuencia completa mutada. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo sobre un volumen final de 50µl, empleando 1 unidad de Pfu DNA polimerasa, 5µl de tampón 10x, 2µl de mezcla de dNTPs 2'5mM cada uno, 1µl de molde y 5µl de cada uno de los oligos a concentración 10mM. Tras incubación durante 5 minutos a 94°C, las muestras fueron sometidas a 30 ciclos de PCR consistentes en 30s a 94°C, 1 minuto a 65°C y 2 minutos a 72°C.

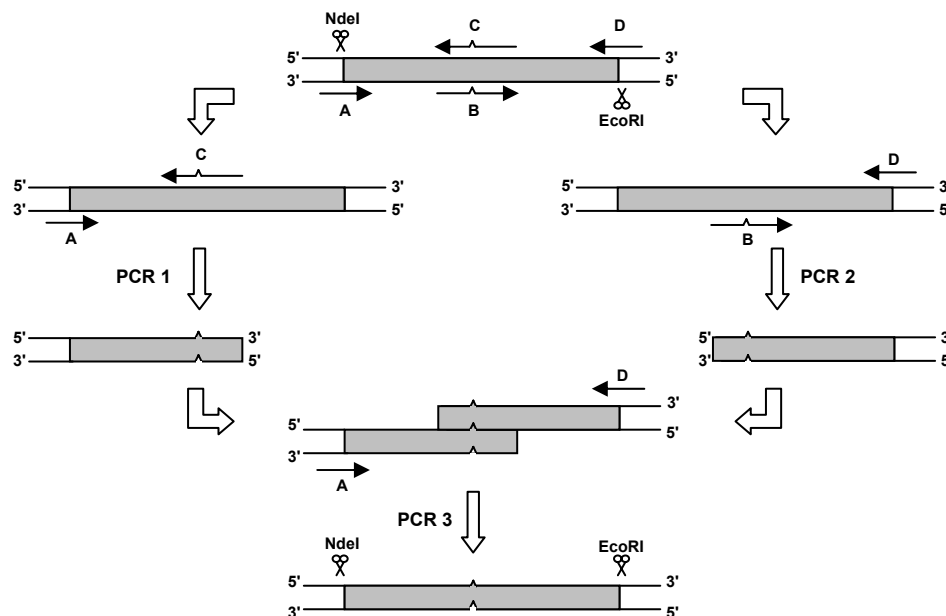


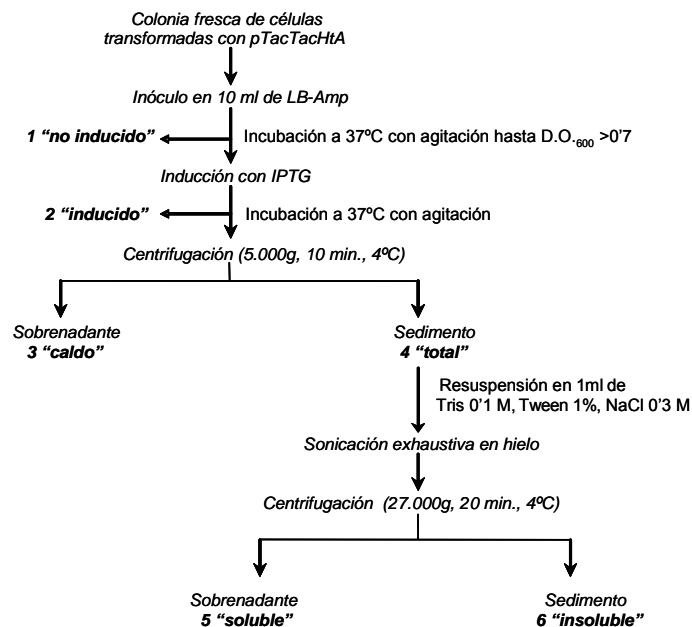
Figura 13. Esquema del procedimiento de mutagénesis por el método de extensión del solapamiento seguido para la obtención de mutantes de HtA. El inserto está flanqueado por las dianas NdeI y EcoRI.

4. Producción y purificación de proteínas

4.1. Optimización de la producción y purificación de hirsutelina a partir de cultivos de *Hirsutella thompsonii*. Para la obtención de HtA a partir de la cepa HTF72 del hongo *Hirsutella thompsonii* se partió esencialmente del procedimiento anteriormente descrito por Mazet y Vey (1995), a partir del cual se fueron introduciendo modificaciones destinadas a optimizar el rendimiento y grado de pureza de la proteína obtenida. Así, inicialmente, a partir de una placa de PDA en la que se conserva el hongo *Hirsutella thompsonii*, se realizó un preinóculo en 100ml de PDB que se puso a crecer a 30°C y 225rpm en oscuridad. Al cabo de unos cuatro días, se observó la aparición de micelio en forma de sedimentos esféricos blancos y uniformes que se inocularon en un volumen final de 2 litros de PDB y se pusieron a crecer en las mismas condiciones en agitador orbital. La producción de HtA se detectó en torno al cuarto día por PAGE-SDS de alícuotas tomadas del medio extracelular, al que el hongo secreta la proteína. Se filtró entonces el medio de cultivo con bomba de vacío para eliminar el micelio y se dializó por tres veces frente a 10 litros de Tris 50mM pH 8'0 para ponerlo en contacto después durante 1 hora a 4°C con una resina de DEAE-celulosa equilibrada previamente en el mismo tampón. El

material no retenido se dializó por tres veces frente a 10 litros de tampón acetato sódico 50mM pH 5.0 antes de ponerlo en contacto con una resina de carboximetilcelulosa (1 hora a 4°C), de la que se eluyó la proteína de interés separándola de otros contaminantes por medio del incremento de fuerza iónica (NaCl 0.4 y 1.0M). Posteriores modificaciones de este protocolo supusieron la adición de una nueva etapa cromatográfica de separación por penetrabilidad en columna P10 y la elución de la proteína de la columna de carboximetilcelulosa por medio de un gradiente entre valores variables de fuerza iónica.

4.2. Optimización de las condiciones de expresión de hirsutelina recombinante en *Escherichia coli*. Con objeto de determinar las mejores condiciones para la expresión de HtA en *E. coli* se ensayaron distintos tipos de células (BL21 (DE3) con y sin tiorredoxina y *codon plus*, HB101 y RB791), medios (LB y Medio Mínimo), concentraciones de inductor (1mM y 2mM de IPTG) y tiempos de inducción (4 horas, una noche y un día), de acuerdo con lo reflejado en el *Esquema 1*. Así, tras la primera centrifugación, los sedimentos resultantes de las distintas pruebas a diferentes concentraciones de inductor y tiempos de inducción fueron resuspendidos en 1ml de tampón de sonicación (Tris 0.1M, Tween 1%, NaCl 0.3M) y, tras sonicación exhaustiva en hielo, se separaron las fracciones soluble e insoluble centrifugando a 15.000rpm y 4°C durante 20 minutos. Las muestras recogidas fueron caracterizadas por PAGE-SDS, comparando su movilidad con la de un patrón de HtA.



Esquema 1. Procedimiento para las pruebas de expresión de HtA en *Escherichia coli*. Los números en negrita hacen referencia a los pasos en los cuales se tomaron alícuotas para su posterior análisis.

4.3. Optimización del aislamiento y purificación de hirsutelina recombinante. A partir del sedimento total obtenido siguiendo idéntico esquema al descrito para las pruebas de expresión en las condiciones óptimas encontradas (*Esquema 1*), se procedió a la purificación de la HtA recombinante partiendo de 2 litros de cultivo de *E. coli*. A fin de favorecer el crecimiento, se inoculó en este caso partiendo de un preinóculo puesto a crecer el día anterior, de volumen 20 veces menor que el final. Se trabajó con los sobrenadantes obtenidos por centrifugación tras la sonicación, donde se encuentra la proteína en forma soluble. La purificación se llevó a cabo mediante una cromatografía de afinidad en resina de Ni^{2+} , probándose distintos tipos de resina con variaciones en el porcentaje del catión divalente. La interacción se realizó en botella y con agitación a 4°C durante 1 hora. La resina había sido previamente equilibrada en tampón Tris 0.1M, Tween 1%, NaCl 0.3M, con agitación y cambios sucesivos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de interacción, se montó una columna de 0.7ml y se realizó un primer lavado con tampón de sonicación (unos 4ml). A continuación, se llevaron a cabo lavados con MOPS 10mM, imidazol 10-30mM, recogiendo fracciones de 1ml hasta alcanzar valores de A_{280} prácticamente nulos (entre 20 y 25 fracciones). Por último, la columna se eluyó totalmente con MOPS 10mM, imidazol 200mM (unos 30ml). Los picos más representativos de las fracciones recogidas fueron caracterizados por electroforesis en PAGE-SDS, comparando su movilidad con la de un patrón de HtA, y se realizó el espectro de absorción de las fracciones resultantes de la elución final para estimar la pureza y cantidad total de proteína. Aquellas muestras en las que se encontró HtA más pura fueron dializadas frente a NH_4HCO_3 50mM, pH 7.0 durante una noche y se conservaron liofilizadas en un congelador a -20°C.

5. Caracterización estructural de las proteínas obtenidas

5.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida. La pureza y la masa molecular de las proteínas presentes en las distintas fracciones obtenidas en los ensayos de expresión y purificación de HtA fue evaluada por electroforesis en geles de poliacrilamida:bisacrilamida (30:1) al 15% en presencia de SDS al 0.1% (p/v) (PAGE-SDS), según el método descrito por Shapiro *et al.* (1967). Las muestras se prepararon por disolución en tampón de aplicación (ver apartado de Materiales), al que se añadió 2-mercaptoetanol al 5% para reducirlas, y se desnaturalizaron por calentamiento a 90°C durante 5 minutos. Las electroforesis se desarrollaron a 25mA por gel en el correspondiente tampón de desarrollo. Posteriormente el gel fue teñido con azul de Coomassie y se utilizó una disolución de ácido acético 7.5%, metanol 20%, para desteñir el fondo y visualizar las bandas de proteína. Las fotografías de los

geles fueron obtenidas en un transiluminador UVI-Tec con el programa informático UVI-Photo.

5.2. Inmunodetección por el método *Western Blot*. Para ratificar la presencia de HtA en las fracciones que parecían contenerla, se llevó a cabo la inmunodetección de la proteína por transferencia de las bandas contenidas en el gel de PAGE-SDS a una membrana de Immobilon-P (Millipore), de tamaño adecuado al gel (9x6cm). La transferencia se realizó en un equipo LKB (Bromma Multiphor II 2117), en tampón de transferencia (ver apartado de Materiales) y a una intensidad de 48mA (0.9mA/cm^2 de gel) durante una hora. Posteriormente, la membrana se saturó en 25ml de PBS con leche en polvo desnatada al 0.1% (p/v), dejándola en agitación toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se incubó la membrana con un anticuerpo monoclonal obtenido en ratón frente a la HtA, cedido por el Dr. Boucias, a una dilución 1/5000. Esta incubación se prolongó durante 3 horas con agitación a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se dio un lavado breve con agua milli-Ro y otro lavado de 30 minutos con 25ml de Tween 20 al 0.5% (v/v), manteniendo la agitación a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubó la membrana durante 1 hora con una dilución 1/3000 del anticuerpo secundario, agitando también a temperatura ambiente. Este segundo anticuerpo, obtenido en cabra, va dirigido contra la fracción constante de las inmunoglobulinas del ratón y lleva acoplada la peroxidasa de rábano. Se repitieron a continuación los dos lavados descritos anteriormente (con milli-Ro y Tween) y se procedió a revelar la membrana con tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobencimidina (DAB) 0.03% (p/v) y H_2O_2 0.016% (v/v) en 50ml de tampón PBS. El agua oxigenada se añadió en el último momento para desencadenar la reacción de la peroxidasa, cuyo producto coloreado permite detectar la banda en la que se encuentra el anticuerpo que incorpora la enzima, que será aquella en la que se localice la HtA. Una vez que aparece la banda, la reacción se detiene por inmersión de la membrana en agua destilada.

5.3. Análisis de aminoácidos. Los análisis de aminoácidos se llevaron a cabo con un analizador automático Beckman Modelo 6300. Las muestras se hidrolizaron en HCl 5.7N con fenol 0.1% (p/v) y *nor*-leucina como estándar interno (0.2ml de volumen total) durante 24 horas a 110°C, en tubos de Pyrex cerrados a vacío. Posteriormente las muestras se secaron y se lavaron dos veces con 0.2ml de agua destilada. Los hidrolizados secos se disolvieron en 50µl de tampón Na-S (Beckman) y se aplicaron en el analizador. El número de aminoácidos fue calculado a partir del área de los picos observados, tomando como referencia la Phe. Estos análisis permitieron calcular también el coeficiente de extinción ($E^{0.1\%}$).

5.4. Determinación de grupos -SH libres. Esta determinación está basada en el método de Ellman (1959). Se prepara una disolución de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) a 0'4mg/ml en tampón Tris-HCl 0'1M, pH 7'5 con EDTA 1mM. Se añaden 0'1ml de esta disolución a 3ml de una disolución de proteína (0'2-0'4mg/ml) en tampón fosfato sódico 0'25M pH 7'5, con EDTA 2mM. La mezcla de incubación se mantiene a temperatura ambiente mientras se registra el incremento de absorción a 412nm, utilizando como referencia la disolución de la muestra. Al valor de absorción obtenido cuando esta se estabiliza se resta el de un blanco carente de proteína pero con DTNB. A partir de esa absorción neta se determina la concentración de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico formado, utilizando un coeficiente de extinción molar a 412nm de $13.600\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Este dato permite determinar el contenido en grupos -SH libres a partir de la concentración de proteína utilizada en el ensayo.

5.5. Espectros de absorción en la región UV-Visible. Las medidas de absorbancia se realizaron bien en un espectrofotómetro Beckman DU640 o bien en uno Uvikon 930. Para ello se emplearon cubetas de cuarzo de 0'1 a 1'0cm de paso óptico, dependiendo del volumen y concentración de la muestra, y una velocidad de barrido de 200-300nm/min. La concentración de proteína se determinó rutinariamente a partir de su coeficiente de extinción $E^{0'1\%}$ (280nm, 1cm), calculado por análisis de aminoácidos.

5.6. Espectros de fluorescencia. Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron en un espectrofluorímetro SLM Aminco 8000C, equipado con una lámpara de arco de xenón de 450W, empleando cubetas de 0'2x1cm o 0'4x1cm de paso óptico. Las medidas fueron realizadas a 25°C, controlándose la temperatura con un baño termostatzado de agua circulante Polystat. La anchura de rendija fue de 4nm, tanto para el haz de excitación como para el de emisión. La concentración de las muestras se mantuvo en torno a 0'1mg/ml. Las medidas se llevaron a cabo excitando a longitudes de onda de 275 y 295nm y registrando los espectros de emisión entre 280 y 400nm, y entre 300 y 420nm, respectivamente. El tampón utilizado fue fosfato sódico 50mM pH 7'0, NaCl 0'1M en la mayoría de los casos. Las unidades en que se expresan estas medidas son arbitrarias, normalizadas para el valor máximo en el espectro de emisión para la excitación a 275nm de la proteína.

5.7. Estudios de desactivación de fluorescencia. Se estudió la desactivación de la fluorescencia de la HtA debida a la presencia de yoduro potásico y acrilamida. Para ello, se fueron añadiendo alícuotas de desactivador a una disolución de 0'1mg/ml de proteína en tampón MOPS 15mM, NaCl 0'1M, EDTA 1mM, a pH 7'0. En el caso del yoduro potásico, se había añadido previamente a esta disolución disulfito sódico a una concentración final de

10mM, para evitar en lo posible la formación de yodo que pudiera interaccionar con la proteína (Lakowicz, 1983). Después de la adición de cada alícuota de agente desactivador se registró un espectro de emisión de fluorescencia tras excitación a 295nm, longitud de onda a la que no absorben significativamente el ión yoduro ni la acrilamida, con lo que se minimiza el efecto de filtro interno. El análisis cuantitativo del efecto de ambos agentes se efectuó a partir de la medida de intensidad de fluorescencia a 330nm, a la cual la proteína presenta su máximo de emisión. En un primer lugar, los resultados se ajustaron al modelo de Stern-Volmer, descrito por la *Ecuación 1*:

$$F_0/F = 1 + K_D \cdot [Q] \quad \text{Ecuación 1}$$

donde F_0 y F son las intensidades de emisión de fluorescencia en ausencia y presencia de desactivador, respectivamente; $[Q]$ es la concentración de dicho agente desactivador; y K_D es la constante de desactivación de Stern-Volmer. En el caso en que los datos experimentales no ofrecieran un buen ajuste al modelo anterior, fueron analizados según la ecuación de Stern-Volmer modificada (Lehrer, 1971; *Ecuación 2*):

$$F_0/\Delta F = 1/f_a + 1/(f_a \cdot K_D \cdot [Q]) \quad \text{Ecuación 2}$$

donde ΔF es la diferencia entre F_0 y F ; f_a es la fracción de la fluorescencia inicial que resulta accesible al agente desactivador; y K_D es ahora la constante de desactivación de Stern-Volmer para el apagamiento de los residuos accesibles a dicho agente.

5.8. Espectros de dicroísmo circular y cálculo de parámetros termodinámicos. Los espectros de dicroísmo circular se realizaron en un dicrógrafo espectropolarímetro Jasco J-715. Las disoluciones de proteína se analizaron en cubetas de cuarzo de 0'01 a 0'1cm de paso óptico en la región del UV lejano (250-195nm) y de 1cm en el UV próximo (350-250nm). La concentración de proteína empleada para las medidas en las regiones del UV lejano y próximo se mantuvo comprendida en los intervalos 0'2-0'5mg/ml y 0'5-1'0mg/ml, respectivamente. La concentración de proteína fue determinada por medidas de absorbancia, o bien mediante análisis de aminoácidos. Se llevaron a cabo cuatro acumulaciones por espectro. Los estudios de estabilidad térmica se realizaron midiendo de forma continua la variación de la elipticidad a 205nm en un intervalo de temperatura entre 25 y 85°C, a una velocidad de barrido de 0'5°C/min. El valor de la T_m (o temperatura correspondiente al 50% de la desnaturalización de la proteína) se calculó como el máximo de la curva que resulta de la derivada de estos registros. La temperatura se controló con un

baño termostatzado de agua circulante Neslab RTE-111. El tampón utilizado fue fosfato sódico 50mM pH 7'0, NaCl 0'1M en la mayoría de los casos.

La estabilidad de una proteína viene determinada por la variación de energía libre (ΔG) asociada al equilibrio entre el estado nativo (N) y el desnaturalizado (D). Normalmente, la estabilidad conformacional se define como el valor de $\Delta G_{25^\circ\text{C}}$. Por este motivo, la temperatura a la que se desnaturaliza una proteína no es el único parámetro que determina su estabilidad. No obstante, se puede obtener una valiosa información acerca de la estabilidad de una proteína a partir de sus curvas de desnaturalización térmica, obtenidas mediante medidas de CD o de emisión de fluorescencia, muy especialmente cuando se trata de formas mutadas de una misma molécula. En el caso de las proteínas que se tratan en esta Tesis Doctoral, el análisis se efectuó a partir de las gráficas de CD. Todos los cálculos posteriores se basan en la aproximación de que la desnaturalización responde a un equilibrio entre dos estados: nativo (N) y desnaturalizado (D). Esta dicotomía puede ser verificada mediante medidas de calorimetría diferencial de barrido (DSC). En una desnaturalización entre dos estados se cumple:

$$f_N + f_D = 1 \quad \text{Ecuación 3}$$

donde f_N y f_D son las fracciones molares de proteína presentes en cada uno de los dos estados. Por tanto, cualquier variable espectroscópica (y) puede expresarse en función de dichas fracciones:

$$y = f_N \cdot y_N + f_D \quad \text{Ecuación 4}$$

siendo y_N e y_D los valores de dicha variable correspondientes al estado nativo y desnaturalizado, respectivamente. Estos valores se pueden calcular a partir de la correspondiente gráfica de desnaturalización térmica, obtenida como medida de la variación de y con la temperatura. En el caso de la HtA y sus mutantes, y fue la elipticidad a 205nm. La constante del equilibrio de desnaturalización, $K = f_D/f_N$, según las Ecuaciones 3 y 4, tiene el valor:

$$K = (y - y_N) / (y_D - y) \quad \text{Ecuación 5}$$

De donde podemos estimar ΔG , habida cuenta que:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad \text{Ecuación 6}$$

donde R es la constante de los gases ($R = 1,987 \text{ cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$). De este modo, el análisis de las curvas de desnaturalización térmica, *y versus T*, permite obtener la representación gráfica de ΔG *versus T*. Esta gráfica proporciona con

mayor exactitud el valor de T_m , (temperatura media de la transición a la que $f_N = f_D$ y, por tanto, $K = 1$ y $\Delta G = 0$). Además, la pendiente de dicha gráfica a $T = T_m$ es $-\Delta S_m$ ($\text{cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{A mol}^{-1}$). En efecto, de la *Ecuación 6* se deduce que a $T = T_m$ se cumple que:

$$\Delta G = 0 = \Delta H_m - T_m \cdot \Delta S_m$$

Los valores de T_m y S_m permiten calcular la variación de entalpía a dicha temperatura:

$$\Delta H_m = T_m \cdot \Delta S_m$$

Ecuación 7

Asimismo, la ecuación de Van't Hoff, $d(\ln K)/d(1/T) = -\Delta H/R$, permite calcular el valor de ΔH_m , gracias a la representación gráfica de $\ln K$ *versus* $1/T$ (siendo K calculada según la *Ecuación 5*). La pendiente de la curva para $1/T = 1/T_m$ resulta ser $-\Delta H_m/R$. La coincidencia de los valores de ΔH_m , según se determine por uno u otro método, es una prueba de que la hipótesis de la existencia de un equilibrio entre dos estados es correcta.

5.9. Estudios de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Los estudios de calorimetría diferencial de barrido fueron efectuados con la ayuda de un calorímetro Microcal VP-DSC. Se utilizó este equipo para estudiar la transición térmica de las proteínas objeto de estudio y determinar sus parámetros termodinámicos por tratamiento posterior de los termogramas con el software Origin Microcal LLC DSC. El intervalo de temperaturas en el que se realizaron los barridos fue de 10 a 80°C, con una velocidad de 0.5°C/minuto. Se registraron igualmente los barridos inversos para corroborar la reversibilidad del proceso. La disolución de proteína se preparó en tampón MOPS 50mM, NaCl 0.1M, EDTA 1mM, pH 7.0, con el que se llevó a cabo el registro de la línea base. Todas las preparaciones utilizadas fueron desgasificadas a vacío con agitación durante 10 minutos antes de introducirlas en el calorímetro.

5.10. Estudios de cristalización. Los experimentos de cristalización de la HtA fueron llevados a cabo en el laboratorio de los Doctores Greg Petsko y Dagmar Ringe, en el Rosenstiel Basic Medical Sciences Research Center (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), con la colaboración del Dr. José Manuel Martínez Caaveiro. Se ensayaron las condiciones incluidas en los kits comerciales Crystal Screen y PEG/Ion Screen (Hampton Research), con preparaciones de proteína a concentraciones comprendidas entre 16 y 33mg/ml, tanto a temperatura ambiente como a 4°C. En todos los casos se comprobó el estado de agregación de las disoluciones de proteína mediante medidas de dispersión de luz dinámica (DLS, *Dynamic Light Scattering*).

5.11. Estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Fueron realizados en colaboración con el laboratorio de la Dra. Marta Bruix, del Instituto de Química-Física Rocasolano (C.S.I.C.). Los espectros de ^1H RMN para la hirsutelina se asignaron usando procedimientos de asignación secuencial estándar (Wüthrich, 1986). Los experimentos de RMN se realizaron en espectrómetros de 600 y 800 MHz. Los espectros de ^1H homonuclear TOCSY (Bax y Davies, 1985), con tiempos de mezcla de 60ms, y NOESY (Kumar *et al.*, 1980), con tiempos de mezcla de 50ms, se registraron mediante métodos estándar.

5.12. Enzimoimmunoensayos de inhibición. Se estudió la inhibición de la señal de Asp f 1 frente a IgE contenidas en sueros de pacientes alérgicos a *Aspergillus fumigatus* mediante experimentos de ELISA de inhibición, utilizando como inhibidores la HtA y el mutante Asp f 1 Δ (7-22). Los sueros incluían distintos fenotipos alérgicos, correspondientes a sintomatologías de fibrosis cística (FQ), aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) o ambas, y fueron amablemente cedidos por los Doctores Jesús F. Crespo y Julia Rodríguez, del Servicio de Alergia del Hospital Universitario 12 de Octubre, y Cristina Pascual, del Servicio de Alergia del Hospital Infantil La Paz. Todos los ensayos se llevaron a cabo en placas Costar de 96 pocillos de fondo plano y de alta capacidad de unión. Se tapizaron los pocillos con 100 μl de una disolución de antígeno a 1 $\mu\text{g/ml}$ en PBS pH 7.2, incubando durante 12-16 horas. A continuación, se lavaron las placas con PBS/Tween 20 al 0.5% y se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con 200 μl de tampón de saturación (PBS/Tween 20 al 0.1%-leche en polvo al 3%). Se preincubaron las mezclas de sueros con distintas diluciones del antígeno que se quería usar como inhibidor. La dilución del suero utilizada correspondió en cada caso a la concentración necesaria para que en su titulación mediante ELISA indirecto la densidad óptica fuese de 0.5-1.0. Estas incubaciones se mantuvieron en agitación suave a temperatura ambiente durante 2 horas y, transcurrido este tiempo, se añadieron a los distintos pocillos (100 μl en cada uno). A continuación, se incubó la placa durante 2 horas a 37°C y, tras un nuevo lavado, se incubó durante 1 hora a 37°C con el segundo anticuerpo, monoclonal anti-IgE humana obtenido en ratón, diluido 1/5000 en tampón de saturación que contenía esta vez leche en polvo al 1.5%. Se volvió a lavar como anteriormente antes de incubar durante 1 hora a 37°C con el tercer anticuerpo, GAM-HRP, que lleva acoplada la peroxidasa de rábano. Después de lavar exhaustivamente las placas, se añadió como sustrato de la peroxidasa o-fenilendiamina (OPD, 0.63mg/ml) en citrato sódico 0.1M, pH 5.0, con un 4% de metanol y un 0.2% de H_2O_2 (100 μl por pocillo). La reacción se detuvo al cabo de 15 minutos con 100 μl por pocillo de ácido sulfúrico 3N. La lectura de la densidad óptica a 492nm de cada pocillo se realizó en un lector ASYS Hitech Expert 96 (GmbH). Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de

inhibición producido frente a concentración de inhibidor, estimados de acuerdo a la Ecuación 8:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \cdot [1 - (\text{DO}_{\text{obs}} - \text{DO}_{\text{blanco}}) / (\text{DO}_{\text{máx}} - \text{DO}_{\text{blanco}})] \quad \text{Ecuación 8}$$

donde DO_{obs} es la densidad óptica observada a 492nm para la correspondiente concentración de inhibidor; $\text{DO}_{\text{blanco}}$ es la densidad óptica a 492nm en los pocillos en los que el tapizado inicial se llevó a cabo con PBS en lugar del antígeno; y $\text{DO}_{\text{máx}}$ es la densidad óptica a 492nm en aquellos pocillos en las que las incubaciones se realizaron en ausencia de inhibidor. Para cada punto de utilizaron un mínimo de dos determinaciones independientes.

6. Ensayos de actividad ribonucleolítica

6.1. Actividad frente a polinucleótidos. Como una primera aproximación al chequeo de la actividad de las proteínas obtenidas se ensayó su efecto sobre distintos polinucleótidos en geles de poliacrilamida polimerizados en presencia del sustrato en cuestión. Este tipo de ensayos, que suponen la detección *in situ* de la actividad de enzimas previamente separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, se ha utilizado desde hace varias décadas para proteínas muy distintas y se conocen con el nombre de zimogramas. Este método presenta varias ventajas, pues un sólo ensayo puede servir para analizar, además de la cantidad de enzima presente, su homogeneidad o su posible contaminación por actividades similares, aunque estén presentes en muy pequeña proporción. Además, se puede usar tanto para extractos biológicos crudos como para las enzimas purificadas. Ahora bien, cuando la electroforesis se realiza en presencia de SDS en condiciones desnaturalizantes hay una dificultad añadida para poder realizar este tipo de detección, que es la necesidad de renaturalizar la enzima, lo que no siempre es posible. Sin embargo, en el caso de las ribonucleasas, especialmente las secretadas y consideradas como digestivas (por ejemplo, las de la superfamilia de la RNasa A en mamíferos o las de la T1 y T2 en microorganismos), se han podido desarrollar con cierta facilidad este tipo de ensayos gracias a que suelen ser enzimas muy estables y fácilmente replegables, al menos si no se reducen sus puentes disulfuro.

El método utilizado consiste en embeber el RNA directamente en el gel de poliacrilamida, ya que, dado su gran tamaño, no migra a través del gel durante la electroforesis. Esta se lleva a cabo utilizando muestras no reducidas para que la desnaturalización inducida por el SDS sea reversible. En general, se aplicaron 0'5-1µg de proteína, aunque el umbral de detección se encuentra en 0'1µg. Posteriormente se elimina el SDS mediante una serie de lavados con isopropanol y, una vez conseguido esto, se lleva a cabo la reacción

ribonucleolítica mediante incubación en un tampón y a una temperatura adecuados. El RNA no degradado se detecta por tinción con un colorante de ácidos nucleicos, como el azul de toluidina; sin embargo, allí donde se produce degradación del RNA no actúa el colorante, impidiendo que esta zona del gel se tiña de color azul. Este método fue descrito en detalle por Blank y colaboradores, que utilizaron el isopropanol en disolución acuosa tamponada para eliminar eficazmente el SDS (Blank *et al.*, 1982). Estos autores también habían utilizado previamente distintos RNA para detectar RNasas de distinta especificidad (Blank y Dekker, 1975). Más recientemente se han desarrollado nuevas posibilidades prácticas de este ensayo (Bravo *et al.*, 1994). La adaptación de los zimogramas a la detección de ribonucleasas ha sido muy útil como criterio de pureza, especialmente en lo que concierne a pequeñas contaminaciones por otras RNasas menos específicas pero mucho más activas frente a RNA, lo que resulta especialmente importante para poder llevar a cabo ensayos de actividad catalítica con sustratos distintos del ribosoma.

Los geles se prepararon como habitualmente para PAGE-SDS, pero añadiendo el polinucleótido a 0'3mg/ml en el gel separador. Las muestras se prepararon en el tampón de aplicación de electroforesis habitual, pero sin agente reductor, y se calentaron a 80°C durante 20 minutos. La aplicación y desarrollo de la electroforesis fueron los usuales. Para la detección de las actividades ribonucleolíticas, el gel se sometió a las siguientes incubaciones, utilizando unos 100ml de cada solución:

1. 2 x 15 minutos en Tris-HCl 10mM pH 7'5 a temperatura ambiente.
2. 2 x 15 minutos en Tris-HCl 10mM pH 7'5, 25% isopropanol a temperatura ambiente.
3. 2 x 15 minutos en Tris-HCl 10mM pH 7'5 a temperatura ambiente.
4. 1 hora en Tris-HCl 0'1M pH 7'5 a 37°C.
5. 10 minutos en Tris-HCl 10mM pH 7'5 a temperatura ambiente.
6. 15 minutos en azul de toluidina 0'2% en Tris-HCl 10mM pH 7'5 a temperatura ambiente
7. Lavados con agua para desteñir, hasta conseguir el grado de contraste adecuado.

6.2. Actividad frente a ribosomas. La actividad de las proteínas estudiadas frente a ribosomas eucariotas fue analizada ensayando su efecto sobre el lisado de reticulocitos de conejo libre de células que comercializa la casa Promega, según describen Lamy *et al.* (1992). Este lisado, diluido en relación 1'5:2'0 en tampón de ensayo (Tris 40mM, KCl 40mM, EDTA 10mM, pH 7'5), se trató en cantidad de 50µl con 50-200ng de proteína durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por adición de 0'25ml de tampón Tris 50mM, SDS 0'5%, pH 7'4, y posterior incubación de la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. La extracción del RNA se llevó a cabo en fenol

saturado en agua, precipitando con isopropanol. En todos los pasos se empleó material tratado contra RNasas, adquirido a la casa Ambion o calentado previamente a 180°C durante 8 horas, en el caso del material de vidrio. Las soluciones acuosas fueron preparadas con agua milli-Q tratada con DEPC (dietilpirocarbonato, inhibidor de RNasas), para lo que se añadió este compuesto al 0'1% y se autoclavó después de haber incubado una noche a 37°C. El resultado del ensayo se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 2'4% (p/v), polimerizado en presencia de formaldehído al 16% (v/v), desarrollado a 80 V durante 1 hora en tampón MOPS 20mM, acetato sódico 5mM, EDTA 1mM, pH 7'0, y revelado por tinción con bomuro de etidio e irradiación con luz UV. Las bandas resultantes fueron cuantificadas haciendo uso del programa de fotodocumentación UVI-Band, perteneciente al software UVI-soft Windows Application V97.04.

6.3. Actividad frente al SRL. Con el fin de ensayar la actividad de las proteínas purificadas frente al bucle sarcina/ricina, se procedió en primer lugar a la síntesis por transcripción *in vitro* del mismo mediante la utilización del kit MegaShortscript (Ambion). Para ello, se mezclaron los oligonucleótidos PSRL y PT7 y se calentaron 3 minutos a 70°C, dejándolos enfriar posteriormente a temperatura ambiente durante 5 minutos. La concentración de ambos oligonucleótidos en el proceso de síntesis fue de 5µM. La reacción se desarrolló en un volumen final de 20µl, de los cuales 2µl corresponden al tampón 10x, 8µl a la mezcla de NTPs, y 2µl a la mezcla enzimática, basada en la RNA polimerasa del fago T7 (todos estos componentes son suministrados en el kit comercial). La mezcla se incubó durante 2-5 horas a 37°C con agitación. Transcurrido ese tiempo, la reacción se detuvo mediante adición de 1µl de DNasa I e incubación a 37°C durante 30 minutos. La separación del producto resultante se efectuó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 19% en presencia de urea 7M, desarrollada en TBE durante 35 minutos a 300V. La banda correspondiente al SRL fue recortada tras visualización por irradiación con luz ultravioleta y eluida del gel por adición de 850µl de agua destilada e incubación durante una noche a temperatura ambiente con agitación. Al día siguiente, el RNA fue precipitado durante 30 minutos a -80°C con una mezcla de glucógeno, acetato sódico y etanol puro a -20°C. El sedimento se lavó con etanol al 70% a -20°C y, tras dejarlo secar, se resuspendió en agua tratada contra RNasas.

Para el análisis de la actividad ribonucleolítica sobre el sustrato así obtenido, en un volumen final de 6µl se añadieron sobre el tampón de ensayo (Tris-HCl 50mM, NaCl 0'1 M, EDTA 5mM, pH 7'0) el RNA, previamente calentado 5 minutos a 70°C y enfriado 10 minutos a temperatura ambiente, y la proteína, en este orden. Tras un pulso de centrifuga, se incubó la mezcla a 37°C durante 15 minutos, transcurridos los cuales se detuvo la reacción por adición de

4µl de formamida e incubación a 90°C durante 5 minutos. La evaluación del resultado se llevó a cabo por electroforesis en gel de poliacrilamida al 19% en presencia de urea 7M, en TBE (Tris-borato 0'045 M, EDTA 1mM). Las muestras se prepararon añadiendo 10µl de tampón de aplicación 2x (urea 7M, 0'1% azul de bromofenol en TBE) y se dejó correr el gel a 300V hasta que el colorante alcanzó los 2/3 del mismo. Las concentraciones de RNA y proteína empleadas en el ensayo fueron de 2µM y 1µM, respectivamente.

6.4. Actividad frente a dinucleósidos monofosfato. Para cuantificar la actividad de las RNasas utilizadas en este trabajo también se han empleado como sustratos los dinucleósidos fosfato ApA y CpC. En este tipo de ensayo se analiza la capacidad mínima de estas enzimas para hidrolizar un enlace fosfodiéster. En condiciones naturales, las ribonucleasas actúan frente a un polirribonucleótido, por lo que se debe asumir que en estos ensayos se analizan las características esenciales mínimas que permiten romper enlaces fosfodiéster. En el caso de las ribonucleasas microbianas no tóxicas, como la RNasa U2, se puede analizar la hidrólisis del ApA registrando la variación espectrofotométrica de la misma, según describen Yasuda e Inoue (1982). Esta determinación no es posible para la α -sarcina, dada la escala de tiempo en que transcurre la reacción. Por ello, para las ribotoxinas se utiliza un método de separación por HPLC (Lacadena *et al.*, 1998), adaptado a partir del descrito por Shapiro *et al.* (1986). Esta forma de medir la reacción requiere más tiempo, pero presenta la ventaja de que se puede cuantificar la aparición de cada uno de los productos por separado.

El tampón empleado para la reacción fue fosfato sódico 50mM, con NaCl 0'1M y EDTA 5mM, ajustado al pH al que se desee medir la actividad. En el tampón se disolvía la enzima (entre 0'5 y 10µM) y el dinucleósido fosfato. Las concentraciones de ApA y CpC se calcularon según los coeficientes de extinción molar $\epsilon_{260} = 18.600\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{260} = 18.100\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectivamente. Se realizaron siempre los correspondientes controles sin enzima. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, durante 15-17 horas, y se detuvieron mediante congelación en aire líquido. La separación de los productos se realizó en un cromatógrafo de HPLC System Gold de Beckman, equipado con un detector modelo 166 y una columna de fase inversa Kromasil 100 C18 (5µm, 0'46 x 15cm). La elución se llevó a cabo a temperatura ambiente con un gradiente lineal de 35 minutos en el que se pasaba de tampón fosfato potásico 100mM pH 7'0 a tampón fosfato potásico 90mM pH 7'0 con 32'5% de metanol, con flujo de 1ml/min. Los picos fueron detectados registrando la absorbancia a 254nm, y se cuantificaron con el programa Beckman System Gold. La constante de Michaelis (K_M), la velocidad máxima ($v_{\text{máx}}$) y la constante catalítica (k_{cat}) se calcularon según el modelo de Michaelis-Menten, ajustando los datos mediante regresión lineal al modelo de dobles inversas de Lineweaver-Burk.

7. Ensayos de interacción con lípidos

7.1. Formación de las vesículas. Tras la obtención de una película de lípido por evaporación a vacío de una disolución del mismo en cloroformo/metanol (2:1, v/v), se prepararon las vesículas mediante una primera hidratación a 37°C durante una hora en el tampón adecuado, según el tipo de ensayo a realizar. Posteriormente, la suspensión lipídica resultante se sometió a cinco ciclos de extrusión en un extruder Lipex Biomembranes, a través de dos filtros de policarbonato (Nuclepore) de 100nm de diámetro de poro, resultando una población de vesículas unilamelares con un diámetro promedio aproximadamente igual al del poro del filtro (Hope *et al.*, 1985; Mayer *et al.*, 1986). En los ensayos de liberación de contenidos acuosos, basados en la cuantificación de la liberación de un soluto encapsulado en el interior de las vesículas lipídicas, la formación de estas requirió de algunos pasos adicionales. Así, la hidratación de la películas de lípido se realizó en este caso en Tris 10mM, pH 7.5, con NaCl 20mM, ANTS 12.5mM (solutos fluorescentes) y DPX 45mM (desactivador colisional del anterior fluoróforo) (Ellens *et al.*, 1985; Parente *et al.*, 1990; Murata *et al.*, 1992), a una concentración final de lípido de 2mg/ml. Antes de los ciclos de extrusión se sometió la suspensión a cinco ciclos de congelación-descongelación en aire líquido para favorecer la encapsulación. Por último, los solutos no encapsulados se separaron mediante una cromatografía de penetrabilidad en columna de Sephadex G-75 Super Fine (1.5x20cm), equilibrada en tampón Tris 10mM pH 7.5, NaCl 0.1M, EDTA 1mM.

7.2. Valoración de fósforo. La concentración real de lípidos en las suspensiones obtenidas fue contrastada por valoración de fósforo inorgánico basada esencialmente en el método de Barlett (1959). El reactivo de Fiske-Subbarow se preparó disolviendo 6.25mg de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico (ANSA) y 5g de bisulfito sódico en agua destilada hasta completar 25ml de disolución. La reacción se basa en la reducción del molibdeno hexavalente del complejo fosfomolibdato amónico (formado por la reacción en medio ácido entre el fosfato inorgánico y el molibdato amónico) con el reactivo de Fiske-Subbarow, para formar un complejo de color azul. El protocolo consiste en añadir 0.3ml de ácido sulfúrico 10N a la muestra a valorar, incubándola durante 2 horas a 190-200°C. Posteriormente, y tras dejarla enfriar, se adicionan 3 gotas de H₂O₂ al 30%, agitando y volviendo a incubar otras dos horas a la misma temperatura. Por último, se diluye la muestra con 0.3ml de agua destilada y se añaden 0.2ml de una disolución de molibdato amónico al 5%, así como 0.2ml del reactivo preparado. Finalmente, tras agitación, la muestra se incubaba a 80-90°C hasta la aparición de color azul (unos 20 minutos). Se mide la absorbancia a 830nm y los valores resultantes se interpolan en una recta de calibrado

obtenida a partir de disoluciones de KH_2PO_4 , con cantidades comprendidas entre los 50 y 1000ng de fósforo.

7.3. Ensayos de agregación de vesículas. Los ensayos de agregación de vesículas fueron llevados a cabo a diferentes relaciones proteína/lípido en forma de cinéticas, utilizando un espectrofotómetro Beckman DU640, en el que se registró absorbancia neta a 360nm a intervalos de 5 segundos durante 20 minutos a una temperatura de 37°C, superior a la T_m del lípido. Se probaron vesículas de DMPG, DMPC y DMPC:colesterol (1:1). El tampón empleado fue Tris 15mM, NaCl 0'1mM, EDTA 1mM, pH 7'0.

7.4. Ensayos de liberación de contenidos acuosos. Para analizar la posible liberación de contenidos acuosos inducida por HtA sobre vesículas de PG de huevo se midió el incremento de fluorescencia de la sonda ANTS con el tiempo en un espectrofluorímetro SLM Aminco 8000C, equipado con una lámpara de arco de xenón de 450W y que permite controlar la temperatura (37°C) por medio de un baño termostatzado de agua circulante Polystat. La liberación de los contenidos acuosos al medio externo por acción de la proteína supone la dilución tanto del ANTS como del DPX, lo que conlleva una disminución de la eficacia de la desactivación de la fluorescencia del ANTS y, por tanto, un aumento drástico en su emisión de fluorescencia. El estudio se llevó a cabo en Tris 10mM, NaCl 0'1 M, EDTA 1mM, pH 7'5, con un filtro de 535nm, excitando a 386nm y registrando emisión a 530nm. Se emplearon polarizadores a 90° y 0° para la excitación y la emisión, respectivamente, y un ancho de rendija de 4nm en ambos casos. Las relaciones molares proteína/lípido ensayadas cubrieron el intervalo que va de 0 a 25×10^{-3} y los resultados se expresan como porcentajes de liberación (%L) relativos al logrado por adición de Triton X-100, según la Ecuación 9:

$$(\% L) = 100 \cdot (F_p - F_0) / (F_{100} - F_0) \quad \text{Ecuación 9}$$

donde F_0 es la intensidad de fluorescencia antes de la adición de la proteína (corregida por la correspondiente dilución); F_p es la intensidad de fluorescencia final tras añadir la proteína; y F_{100} se corresponde con la intensidad de fluorescencia obtenida tras añadir una pequeña alícuota de Triton X100 (concentración final 0'5% p/v), que produce el máximo grado de liberación.

7.5. Ensayos de unión a vesículas fosfolipídicas. Se trató de evaluar la posible unión de la proteína objeto de estudio a vesículas de distintos lípidos por ultracentrifugación de muestras resultantes de la incubación de ambas especies y posterior cuantificación de la proteína presente en el sobrenadante mediante registro de la absorbancia a 280nm. Así, se prepararon vesículas fosfolipídicas

de PG, DMPG, DMPC y DMPS a 8mg/ml, según lo descrito previamente. En un volumen final de 250µl, se incubó durante 1 hora a 37°C la proteína (a concentración tal que su A_{280} estuviera alrededor de 0'1) con las vesículas, a una relación molar proteína/lípido de 7×10^{-3} . Transcurrido ese tiempo, 230µl de cada una de las incubaciones fueron transvasados a tubos de propionato de celulosa y sometidos a centrifugación a vacío a 200.000g durante 1 hora a 4°C. La centrifugación se llevó a cabo en una ultracentrífuga Beckman, modelo XL 90, haciendo uso de un rotor 42.2 Ti. Finalmente, se recogieron los sobrenadantes y se registraron espectros de absorción en el intervalo 240-340nm. Se llevaron a cabo controles para evaluar la sedimentación de la proteína y las vesículas por separado. El ensayo se efectuó en tampón MOPS 50mM, NaCl 0'1M, EDTA 1mM, a pH 7'0.

7.6. Titulación con lípidos de los espectros de dicroísmo y fluorescencia. El efecto de vesículas de DMPG sobre la fluorescencia y dicroísmo de la hirsutelina fue evaluado registrando los correspondientes espectros, en las condiciones ya descritas previamente, tras incubación a 37°C a diferentes relaciones molares proteína/lípido, comprendidas entre 3×10^{-3} y 0'1. En todos los casos las medidas de fluorescencia fueron corregidas para la absorbancia aparente y se restaron las líneas base correspondientes al lípido en ausencia de proteína.

7.7. Estudios de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Se hizo uso de esta técnica para evaluar la influencia sobre el termograma de la HtA de vesículas de PG en relación saturante (relación molar proteína/lípido = 3×10^{-3}). También se determinó el efecto de la proteína sobre la transición térmica de DMPG a una relación molar proteína/lípido de 24×10^{-3} . Los termogramas se obtuvieron y analizaron de acuerdo a la metodología ya descrita para la caracterización estructural de la proteína haciendo uso de esta técnica, en el mismo tampón de ensayo (MOPS 50mM, NaCl 0'1M, EDTA 1mM, pH 7'0). Todas las preparaciones utilizadas fueron desgasificadas a vacío con agitación durante 10 minutos antes de introducirlas en el calorímetro.

7.8. Estudios de Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC). La Calorimetría de Titulación Isotérmica es la única técnica que permite medir directamente energías de unión entre moléculas biológicas. A través de ella se pueden determinar de forma precisa la energía de Gibbs, la entalpía, la entropía, la estequiometría y la constante asociadas a la unión de dos especies (Velázquez-Campoy *et al.*, 2004). El aparato de ITC permite inyectar el ligando desde una jeringa sobre la macromolécula cuya unión al mismo se desea caracterizar contenida en una celda. Las diferencias de capacidad calorífica inducidas en la celda como resultado de cualquier proceso que implique intercambio de calor

son registradas en forma de picos cuya integración permite posteriormente calcular los cambios de entalpía asociados a cada inyección. Estos cambios disminuyen a medida que se produce la saturación de la macromolécula presente en la celda por parte del ligando, con lo cual típicamente se obtiene una curva a partir de cuya forma y diferencia de calor entre los estados inicial y final se pueden determinar los parámetros termodinámicos y cinéticos de la interacción objeto de estudio.

Se trató de titular mediante esta técnica la unión de HtA a vesículas de DMPG, con el fin de obtener los parámetros termodinámicos de dicha interacción. Para ello, se hizo uso de un calorímetro de titulación VP-ITC de Microcal. Los experimentos se llevaron a cabo a 37°C, en tampón MOPS 50mM, NaCl 0'1M, EDTA 1mM, a pH 7'0. Se ensayaron distintos diseños experimentales, invirtiendo las posiciones de proteína y lípido entre la jeringa y la celda y modificando las cantidades de ambas moléculas, el número de inyecciones y el espaciado entre las mismas, buscando conseguir una buena recuperación de la línea base y una adecuada distribución e intensidad de los picos. Se desgasificaron las muestras a vacío con agitación durante 10 minutos antes de introducirlas en el calorímetro.

8. Ensayos con células

8.1. Ensayo de citotoxicidad por inhibición de la biosíntesis de proteínas. Este ensayo fue esencialmente realizado de acuerdo a lo descrito anteriormente por Olmo *et al.* (2001), utilizando tanto células de rhabdomiosarcoma como fibroblastos humanos. El efecto sobre las células, reflejado en la inhibición de la biosíntesis de proteínas, fue analizado por medición de la incorporación de L-[4,5-³H]leucina (166Ci/mmol). La radioactividad se cuantificó por medio de un contador de centelleo líquido Beckman LS 3801. Los resultados se expresan como porcentajes de incorporación respecto a muestras control.

8.2. Ensayo de citotoxicidad sobre células de insecto. Se analizó el efecto citotóxico de HtA y α -sarcina sobre células de insecto de las líneas Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) y High Five (*Trichoplusia ni*). Para ello, se sembraron placas de 24 pocillos añadiendo 450 μ l de suspensión de células al 80% de confluencia en medio Insect X-Press, suplementado con gentamicina a 10mg/l, y se añadió la proteína en un volumen de 50 μ l, a concentración final comprendida entre 0'001 y 50 μ M. Las disoluciones de proteína fueron preparadas por dilución seriada en medio Insect X-press y esterilizadas por filtración. Al cabo de 60-84 horas las diferencias en el crecimiento de las células tratadas con respecto a los controles en ausencia de proteína eran ya suficientemente notorias,

con lo que se procedió entonces a tomar fotografías en un microscopio Nikon Eclipse TE 2000-U y al recuento de células vivas en cámara de Neubauer mediante tinción con azul Tripán. Los resultados se expresaron como porcentaje de células vivas frente a concentración de proteína.

RESULTADOS

1. Producción y purificación de hirsutelina a partir de cultivos de *Hirsutella thompsonii*

El primer requisito para abordar el estudio de la HtA suponía disponer de un procedimiento de purificación que permitiera obtener la proteína con el rendimiento y grado de pureza necesarios para su posterior caracterización estructural y funcional. Se partió del procedimiento de obtención de HtA publicado por Mazet y Vey (1995), a partir del cual se fueron introduciendo una serie de modificaciones encaminadas a optimizar el rendimiento e incrementar la pureza de la proteína obtenida. Dicho procedimiento consistía inicialmente en una etapa de precipitación con sulfato amónico, seguida de dos cromatografías de intercambio iónico (en DEAE-Trisacryl a pH 8'0 y CM-Trisacryl a pH 5'0, sucesivamente), y permitía obtener HtA con un rendimiento de 35µg por gramo de micelio seco (~1'5mg por litro de cultivo).

En primer lugar, se mejoró la producción de HtA a partir de cultivos de *Hirsutella thompsonii* modificando las condiciones de crecimiento del hongo. El cultivo a 30°C en lugar de los 25°C previamente descritos permitió aumentar la producción de la proteína de interés, que resultó ser óptima al cuarto día de crecimiento, disminuyendo además su degradación. En cuanto al procedimiento de purificación, se suprimió la precipitación inicial, procediéndose directamente a someter los filtrados del medio de cultivo a una cromatografía de intercambio iónico en resina de DEAE-celulosa, en la que quedaban retenidos pigmentos y otros componentes de alta masa molecular. La fracción no retenida en este primer paso cromatográfico incluye todavía un gran número de proteínas que se cargan en la columna de carboximetilcelulosa, en la que, como se puede

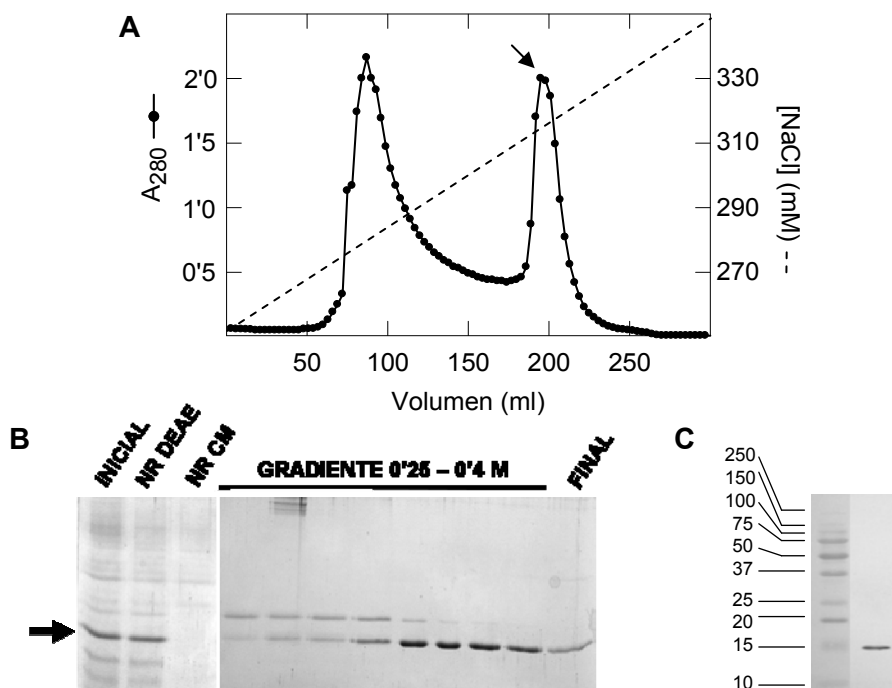


Figura 14. A: Perfil de elución de la HtA de la columna de carboximetilcelulosa por incremento de la concentración de NaCl. La proteína de interés eluye a una fuerza iónica en torno a 0'3M. **B:** Electroforesis en PAGE-SDS de las fracciones recogidas en el procedimiento de aislamiento y purificación de HtA a partir de cultivos del hongo *Hirsutella thompsonii*. **NR** hace referencia a las fracciones no retenidas en las columnas de DEAE-celulosa y Carboximetilcelulosa (CM). El pocillo designado como **FINAL** corresponde al lote resultante de la unificación de las fracciones enriquecidas en HtA, cuya inmunodetección por el método *Western Blot* aparece en **C**, donde las cifras hacen referencia a masa molecular expresada en kDa.

observar en la *Figura 14*, quedan retenidas la HtA y un contaminante que no terminaba de ser completamente eliminado en el procedimiento de purificación de Mazet y Vey. Esta impureza se detectaba posteriormente en ensayos de actividad ribonucleolítica contaminando la actividad propia de la HtA.

La cercanía de los valores de pI de ambas proteínas justifica la necesidad de establecer un gradiente extendido entre valores de fuerza iónica comprendidos en un intervalo muy estrecho. Los mejores resultados se obtuvieron con un gradiente lineal entre 0'25 y 0'4M NaCl, en el que el enriquecimiento de las fracciones en HtA según avanza la cromatografía permitió obtener esta proteína con una pureza de al menos el 99%, como se determinó por densitometría del gel correspondiente al lote final. Esto hacía innecesaria una posterior cromatografía de penetrabilidad, con el consecuente ahorro de una nueva etapa en el proceso. La HtA se obtiene así con un rendimiento de unos 10mg por litro de cultivo, cantidad suficiente para satisfacer

los requerimientos de masa para posteriores estudios, especialmente los destinados a la resolución de su estructura. La identidad de la proteína objetivo se confirmó por *Western Blot*, con anticuerpos monoclonales frente a la HtA (Figura 14), y mediante análisis de aminoácidos.

2. Producción y purificación de hirsutelina recombinante en *Escherichia coli*

Con la idea de estar en disposición de producir en un futuro diversos mutantes de la HtA que contribuyeran a la identificación de residuos implicados en su centro activo y otras regiones de interés, se procedió a la obtención de un sistema de producción recombinante de la proteína objeto de estudio. El gen a clonar se obtuvo por PCR a partir del plásmido pSTBlue, cedido por el Dr. Drion Boucias de la Universidad de Florida. A continuación, se intentó lograr la expresión de la proteína en numerosos plásmidos de la familia de los pET y pQE30, estando implicados en la mayoría de las construcciones vectores que habían dado previamente resultados positivos en la expresión de la α -sarcina y otras toxinas, como las esticolisinas I y II. Sin embargo, todos estos intentos resultaron infructuosos y, tras subclonación en TOPO del fragmento de PCR, se logró la inserción del gen de la proteína entre las dianas NdeI y EcoRI del vector pCWori-SR, con lo que se obtuvo el plásmido pTacTacHtA, que permitió la expresión constante de proteína de modo inducible por IPTG (Figura 15).

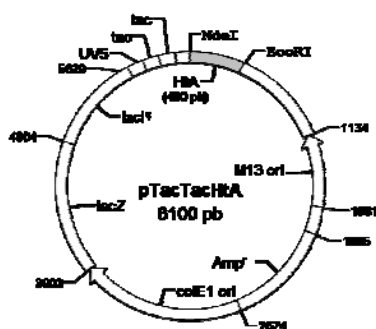


Figura 15. Plásmido pTacTacHtA, utilizado para la expresión de HtA en *E. coli*. El gen de la HtA fue clonado entre las dianas NdeI y EcoRI después de eliminar el gen de la racemasa. Los fragmentos tac permiten la expresión continua y sostenida de proteína. Este plásmido añade una extensión de seis histidinas en el extremo aminoterminal y permite la expresión inducible por IPTG. M13 ori: origen de replicación del fago M13; Amp^r: gen de resistencia a ampicilina; colE1 ori: origen de replicación de la colicina E1; lacZ: gen de la β -D-galactosidasa; lacI^q: gen del inhibidor del operón lactosa; UV5: promotor lacUV5.

Los experimentos de pruebas de expresión se realizaron empleando colonias de distintas cepas de *E. coli* (BL21 (DE3), BL21(DE3) *codon plus*, HB101 y RB791) transformadas con el plásmido pTacTacHtA. Para cada una de ellas se estudió el efecto sobre la expresión de proteína de la concentración de inductor (1mM o 2mM de IPTG), el tiempo de inducción (4, 21 ó 27 horas) y el medio empleado (LB o Medio Mínimo). En la Figura 16 se compara la cantidad de HtA obtenida en las distintas condiciones para la expresión en células BL21 (DE3) crecidas en medio LB, con las que se obtuvieron los mejores resultados.

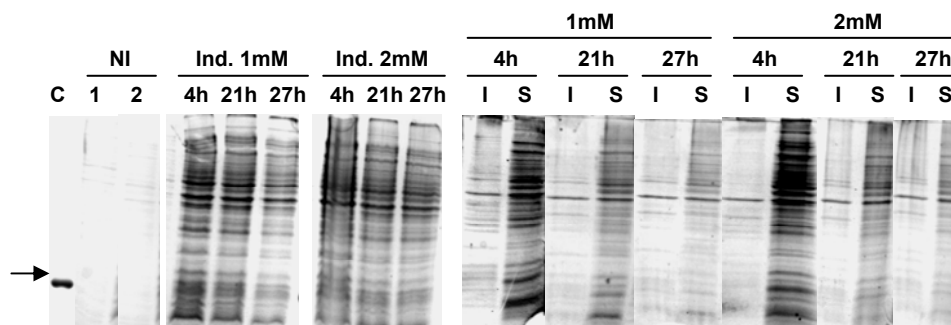


Figura 16. Bandas obtenidas por electroforesis en PAGE-SDS para cada una de las condiciones ensayadas en las pruebas de expresión de HtA en células BL21 (DE3) crecidas en medio LB. Según lo reflejado en el *Esquema 1* (ver apartado de Métodos): **NI**, no inducido (muestra recogida antes de inducir con IPTG **1** ó **2mM**); **Ind. 1mM / 2mM**, muestras recogidas tras inducción con IPTG **1** ó **2mM** durante **4**, **21** ó **27** horas; **I**, fracción insoluble; **S**, fracción soluble; **C**, control de HtA obtenida del hongo (la movilidad de este control es algo mayor que la de la HtA de las muestras por carecer de extensión de histidinas).

Como se puede comprobar, la mayor cantidad de proteína se detecta en la fracción soluble en todos los casos. No se observan diferencias considerables entre la inducción con 1mM y 2mM de IPTG, así como tampoco se aumenta la expresión alargando los tiempos de inducción. Bien al contrario, parece ser que la cantidad de proteína disminuye a medida que estos aumentan, como se puede observar por la mayor intensidad de las bandas a 4 horas y su progresiva disminución a 21 y 27 horas. Esto podría ser debido a la degradación de la HtA en fragmentos más pequeños que hubieran abandonado el gel por su mayor movilidad o a la disminución del número de células productoras a causa del efecto tóxico de la proteína. Los resultados obtenidos para la expresión en medio mínimo son cualitativamente similares a los logrados con LB, pero con mucho menor rendimiento, lo que impidió el posterior empleo de este medio en el marcaje isotópico de la proteína para estudios de RMN. No se muestran aquí resultados relativos a los experimentos con otras cepas por cuanto revelaron una expresión claramente insuficiente de HtA. La presencia de la proteína de interés en las diferentes muestras se confirmó por Western Blot, utilizando tanto anticuerpos monoclonales frente a la HtA como anticuerpos comerciales frente a la extensión de histidinas.

A la vista de estos resultados, se abordó la expresión y purificación de HtA recombinante a partir de cultivos de células BL21 (DE3) crecidas en medio LB, tras inducción durante 4 horas con IPTG 1mM. Para la purificación de la proteína se aprovechó la extensión de seis histidinas que le confiere el plásmido en el que se encuentra clonado su gen y se llevó a cabo una cromatografía de afinidad en resina de Ni^{2+} . Se probaron diferentes resinas con porcentajes variables del catión divalente. Los mejores resultados en cuanto a cantidad de proteína retenida y pureza lograda se obtuvieron con resinas de 5 a 20 μmol

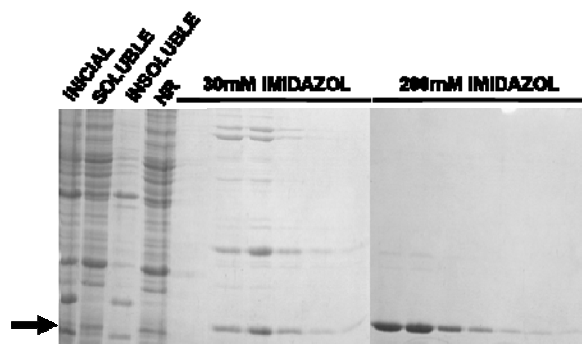


Figura 17. Electroforesis en PAGE-SDS de las fracciones recogidas en la cromatografía de afinidad en columna de Ni^{2+} durante la purificación de HtA recombinante. **NR** hace referencia al material no retenido por la columna.

Ni^{2+} /ml gel. El desarrollo de la cromatografía se optimizó a un lavado con imidazol 30mM y posterior elución con imidazol 200mM. Se consiguió así obtener HtA recombinante con una pureza de al menos el 99% y con un rendimiento de 0'25mg por litro cultivo, lo que resulta aceptable y adecuado para los fines propuestos. Este rendimiento trató de incrementarse en un primer momento mediante el uso de células BL21 (DE3) *codon plus*, que incorporan los tRNA preferidos por la proteína que se desea expresar y que no se encuentran entre los más abundantes en *E. coli* (AGA, AGG, CCC, en el caso de la HtA). Sin embargo, los resultados obtenidos no difirieron mucho de los descritos con la cepa sin modificar. En último término, se diseñaron y obtuvieron por PCR dos mutantes del plásmido empleado introduciendo modificaciones en el sitio de unión del ribosoma (RBS), con la idea de evitar la formación de estructuras secundarias en el RNA, pero tampoco por este procedimiento se logró mejorar la cantidad de proteína obtenida.

3. Caracterización estructural de hirsutelina fúngica y recombinante

Una vez que se disponía de sendos procedimientos de producción y purificación para las formas fúngica y recombinante de HtA, se procedió a su caracterización estructural, encaminada no sólo a confirmar que ambas formas de la proteína eran estructuralmente indistinguibles, sino también a su comparación con otras ribonucleasas, ya que nuestro estudio persigue en último término elucidar la implicación de diferentes partes de la molécula en las distintas propiedades biológicas de la familia de las ribotoxinas.

3.1. Determinación de grupos -SH libres. La ausencia de incremento de absorbancia a 412nm tras el tratamiento con DTNB reveló que la HtA, tanto en su forma fúngica como recombinante, carece de grupos -SH libres, lo que confirma que las cuatro cisteínas presentes en su secuencia de aminoácidos se

encuentran formando dos puentes disulfuro, como es típico en la familia de las ribotoxinas.

3.2. Determinación del coeficiente de extinción. A través de los resultados de análisis de aminoácidos y los espectros de absorción de ambas formas de la HtA se determinaron los valores de sus coeficientes de extinción. Así, $E^{0.1\%}$ (280nm, 1cm) resultó ser 2'00 para la proteína fúngica y 2'05 para la recombinante, valores que se encuentran dentro del 5% de variación respecto del predicho a partir de su composición de aminoácidos. Estos valores fueron los utilizados para la determinación de la concentración de proteína en experimentos sucesivos.

3.3. Espectros de dicroísmo circular y fluorescencia. Los espectros de dicroísmo circular y fluorescencia de la HtA recombinante resultaron ser totalmente coincidentes con los de la proteína fúngica (*Figura 18*), lo que invita a pensar que la extensión de histidinas no afecta sensiblemente a la estructura de la proteína. El aspecto de los primeros en la región del UV lejano informa además de la existencia de una abundancia de estructura tipo β , como corresponde a la familia de las ribotoxinas. En concreto, la deconvolución de los espectros de dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano reveló que la HtA estaría formada por un 16% de hélice α , un 47% de estructuras de tipo β (giros β incluidos) y un 37% de estructura no periódica. También se observa un hombro característico en torno a 290nm (UV-próximo), debido a la abundancia de aminoácidos aromáticos (cuatro triptófanos y cinco tirosinas).

Los espectros de emisión de fluorescencia tras excitación a 275 y 295nm de HtA fúngica y recombinante confirmaron que las relaciones de estructura terciaria que implican a los residuos aromáticos son esencialmente idénticas en ambas formas de la proteína (*Figura 18 C y D*). En ambos casos se detectó una baja contribución de tirosinas, debiéndose mayoritariamente la intensidad de fluorescencia registrada a la emisión adjudicada a los residuos de triptófano.

De forma global, todos estos resultados evidenciaron que la región adicional de seis histidinas no modifica la conformación de la proteína, con lo cual se puede asumir que los estudios realizados con las diferentes variantes de HtA recombinante obtenidas (mutantes y no mutantes) permitirán sacar conclusiones extrapolables al comportamiento de la proteína natural fúngica.

3.4. Estudios de desactivación de fluorescencia. Los experimentos de desactivación de la fluorescencia de HtA se realizaron con el fin de analizar la accesibilidad de sus residuos de triptófano al medio acuoso. La acrilamida y el yoduro ejercen su acción a través de un mecanismo de desactivación colisional, por lo que su eficacia para desactivar la fluorescencia de los triptófanos depende del grado de exposición de estos (Lehrer, 1971; Eftink y Ghiron, 1976). El

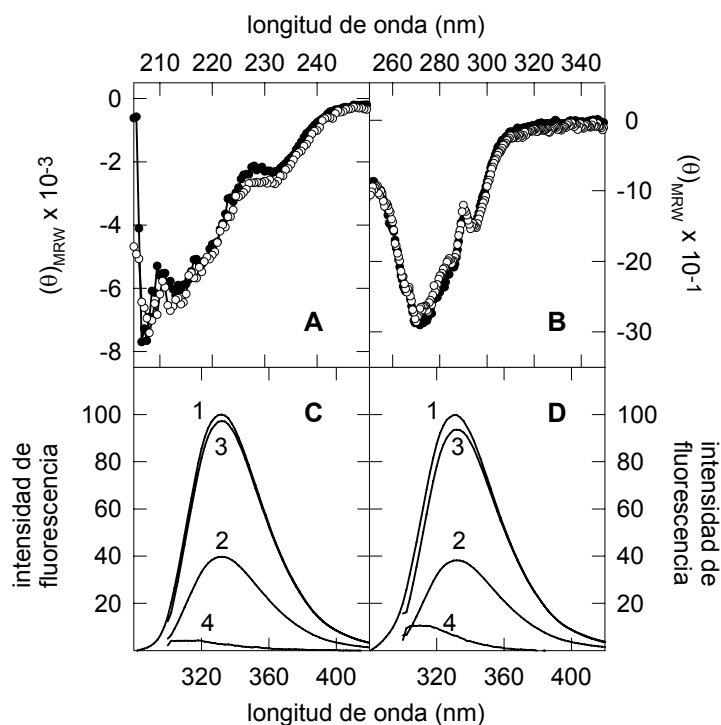
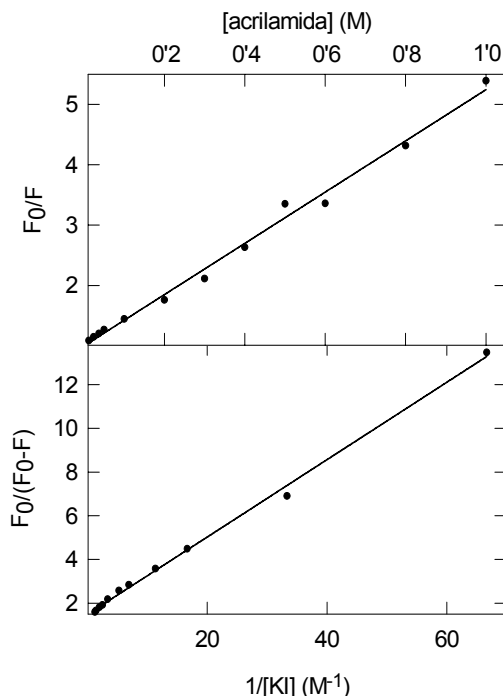


Figura 18. Espectros de dicroísmo circular en las regiones del ultravioleta lejano (**A**) y próximo (**B**) de las formas fúngica (círculos negros) y recombinante (círculos blancos) de HtA. $(\theta)_{MRW}$ (elipticidad molar por residuo) está expresada en unidades de $\text{grado} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$. **Espectros de emisión de fluorescencia** de HtA fúngica (**C**) y recombinante (**D**) para excitación a 275nm (**1**) y 295nm (**2**). Los espectros de emisión tras excitación a 295nm fueron normalizados a longitudes de onda superiores a 380nm, donde la contribución de los residuos de tirosina es prácticamente nula (**3**), y se calcularon los espectros de diferencia (**4** = **1-3**). La emisión correspondiente a triptófanos y tirosinas viene así dada por los espectros **3** y **4**, respectivamente. La intensidad de fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias.

estudio del efecto de los dos agentes mencionados sobre la fluorescencia de la HtA dio lugar a los resultados reflejados en la *Figura 19*. La variación de la emisión a 330nm con la concentración de desactivador se ajusta adecuadamente a una representación de Stern-Volmer directa para el caso de la acrilamida (*Figura 19 A*), lo que informa de la existencia de una única población de fluoróforos, todos ellos igualmente accesibles a este agente ($K_D = 4.2 \text{ M}^{-1}$).

Sin embargo, para el caso del yoduro potásico se obtiene según este modelo una curva convexa, indicativa de la existencia de al menos dos poblaciones de fluoróforos en lo que se refiere a su accesibilidad a este agente desactivador. Por esta razón, los resultados en este caso se analizaron según la representación de Stern-Volmer modificada (*Figura 19 B*). De ella se deduce la fracción de la fluorescencia inicial que resulta accesible a la desactivación



Desactivador	f_a	n	K_D (M^{-1})
Acrilamida	1	4	4'2
Yoduro potásico	0'7	3	8'4

Figura 19. Efecto de la acrilamida y el yoduro potásico sobre la emisión de fluorescencia de HtA.

A: Representación de Stern-Volmer para la desactivación por acrilamida. **B:** Representación de Stern-Volmer modificada para la desactivación por yoduro potásico. F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia y en presencia de desactivador, respectivamente. Los valores de fluorescencia corresponden a intensidad a 330nm tras excitación a 295nm. Los datos de la tabla recogen los valores de fracción de fluorescencia accesible (f_a) y la constante de desactivación (K_D), calculados a partir de la ordenada en el origen y la pendiente, respectivamente; n es el número de residuos accesibles al desactivador.

ejercida por el yoduro (0'7). Teniendo en cuenta que la HtA posee cuatro residuos de triptófano, y considerando que todos contribuyen por igual al espectro de emisión inicial de la proteína, el KI desactivaría la fluorescencia de tres de ellos, con una constante de desactivación de $8'4M^{-1}$. Tanto este valor como el obtenido en el caso de la acrilamida se encuentran próximos a los determinados para otras toxinas con abundancia de triptófanos en su estructura, como es el caso de la esticolisina II (De los Ríos, 1999).

3.5. Estudios de desnaturalización térmica. Los perfiles de desnaturalización térmica obtenidos para la HtA, tanto mediante el registro de la variación de la elipticidad a 205nm como por calorimetría diferencial de barrido (Figura 20), resultaron ser consistentes con un proceso de equilibrio reversible entre dos estados, nativo y desnaturalizado, lo que permite extraer conclusiones acerca de parámetros termodinámicos y estabilidad de la proteína, así como su comparación con el comportamiento termotrópico de otras ribotoxinas. Esta reversibilidad se comprobó, en el caso de las medidas de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano, por medio de la obtención de un espectro que reproducía exactamente el de la proteína nativa después de devolver el sistema a la temperatura inicial. La temperatura en el punto medio de la transición (T_m) determinada según esta técnica resultó ser de 62°C y el incremento de entalpía

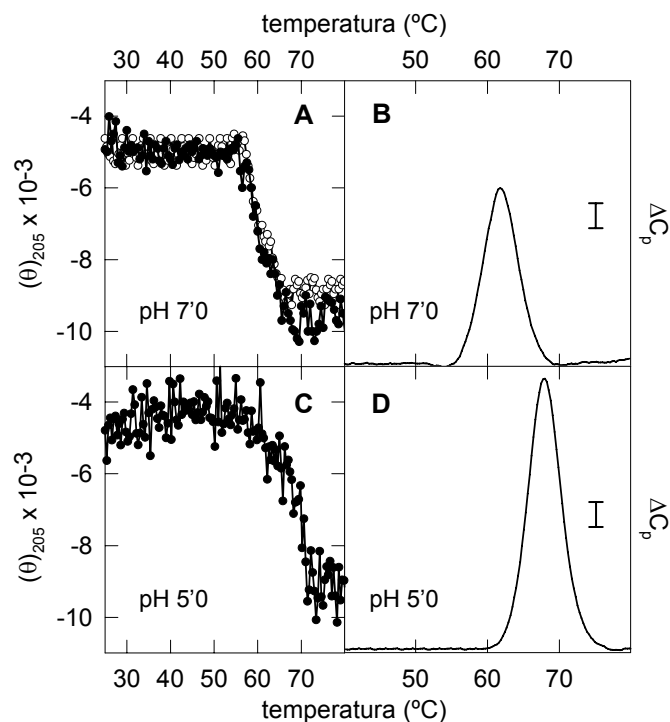
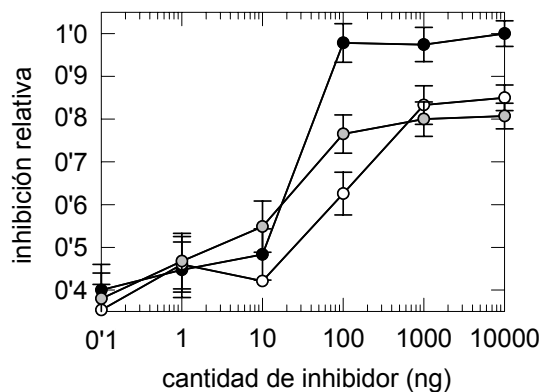


Figura 20. Perfiles de desnaturalización térmica de la HtA. Medida de la variación de la elipticidad a 205nm con la temperatura para HtA fúngica (círculos negros) y recombinante (círculos blancos) a pH 7'0 (A) y a pH 5'0 (C). $(\theta)_{205}$ (elipticidad molar por residuo) está expresada en unidades de $\text{grado} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$. Termograma de la HtA determinado por calorimetría diferencial de barrido a pH 7'0 (B) y a pH 5'0 (D). Las medidas se registraron como incremento de la capacidad calorífica (ΔC_p) frente a la temperatura. La barra a la derecha del termograma representa un incremento de $2 \text{Kcal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$.

(ΔH_m) calculado fue de 93Kcal/mol , valores ambos correspondientes a medidas llevadas a cabo a pH 7'0. Los perfiles de desnaturalización obtenidos para HtA fúngica y recombinante corroboraron que ambas formas de la proteína se encontraban idénticamente plegadas. En el caso de las curvas de DSC, la reversibilidad del proceso de desnaturalización quedó demostrada por la consistencia de los termogramas obtenidos después de varios ciclos de calentamiento y enfriamiento, registrándose estos últimos a la misma velocidad a la que se había ido aumentando previamente la temperatura. En todos los casos se obtuvo un pico único y simétrico, centrado en 61.8°C y de cuya integración se desprende un valor de ΔH_{cal} de 85Kcal/mol , valores también correspondientes a medidas a pH 7'0. Se observaron diferencias en los resultados obtenidos cuando las medidas fueron efectuadas en tampón fosfato 50mM a pH 5'0. En este caso el valor de T_m obtenido por ambas técnicas fue de 68°C , con una ΔH en torno a 100Kcal/mol .

3.6. Enzoinmunoensayos de inhibición. Como se ha comentado en la introducción, las ribotoxinas han sido relacionadas con diversas alergias causadas por *Aspergillus*, y Asp f 1 es la ribotoxina mejor estudiada al respecto (Moser *et al.*, 1992; Kurup *et al.*, 1994, 2002, 2003; García-Ortega *et al.*, 2005a). Con objeto de cuantificar la capacidad de la HtA para inhibir la unión de anticuerpos específicos a Asp f 1, se llevaron a cabo experimentos de ELISA de inhibición utilizando una mezcla de seis sueros de pacientes alérgicos sensibilizados frente al alérgeno principal de *Aspergillus fumigatus*. La inhibición por parte de las proteínas estudiadas de la señal de Asp f 1 frente a las IgE contenidas en estos sueros fue referida al desplazamiento conseguido con cantidades saturantes de Asp f 1, considerando este valor como 1. El efecto de la HtA fue comparado con el de la variante de delección Asp f 1 Δ (7-22).

Figura 21. ELISA de inhibición de la unión de IgE específicas a Asp f 1. Los pocillos de la placa fueron tapizados con 0'1 μ g de Asp f 1. La mezcla de sueros fue preincubada de modo independiente con cada una de las proteínas ensayadas como inhibidores: Asp f 1 (negro), el mutante de delección Asp f 1 Δ (7-22) (blanco) y HtA (gris). La cantidad de inhibidor se representa en escala logarítmica. Cada punto es el promedio de cuatro determinaciones diferentes.



Los resultados se pueden observar en la *Figura 21*. El porcentaje de inhibición alcanzada a la mayor concentración de inhibidor estuvo alrededor del 85% tanto para el mutante Asp f 1 Δ (7-22) como para la HtA. Como era de esperar, el desplazamiento máximo cuando se emplea como inhibidor Asp f 1 se consigue con la misma cantidad de alérgeno que se empleó para tapizar la placa. A la misma concentración, el valor de inhibición obtenida para HtA y Asp f 1 Δ (7-22) es bastante menor, si bien la HtA parece presentar una mayor afinidad por los anticuerpos que la variante delecionada del alérgeno. Esto podría estar informando de la presencia de ciertos residuos en común en la zona epitópica principal de HtA y Asp f 1, residuos que estarían ausentes en el mutante Asp f 1 Δ (7-22).

3.7. Estudios de cristalización. La resolución de la estructura tridimensional de una proteína es una necesidad a la hora de asignar funciones a las diferentes regiones de la molécula. La estructura de la α -sarcina ha sido ampliamente descrita (Campos-Olivas *et al.*, 1996a; Pérez-Cañadillas *et al.*,

2000, 2002, 2003; García-Mayoral *et al.*, 2003, 2006), con lo que la obtención de la estructura de la HtA se planteaba como objetivo fundamental a la hora de establecer comparaciones entre ambas proteínas. De ahí que se abordara la cristalización de la HtA y su posterior estudio por Resonancia Magnética Nuclear.

En cuanto a los intentos de obtención de cristales, se probaron cerca de 200 condiciones entre las incluidas en los kits comerciales Crystal Screen y PEG/Ion Screen (Hampton Research), ninguna de las cuales resultó apropiada para lograr la cristalización de la HtA con preparaciones de proteína entre 16 y 33mg/ml, ni a temperatura ambiente ni a 4°C.

3.8. Estudios de Resonancia Magnética Nuclear. Como ya se ha comentado a la hora de hablar de la expresión de HtA recombinante, la obtención de esta en cantidad razonable en medio mínimo marcado isotópicamente no resultó posible. Por tanto, para los estudios de RMN se suministró HtA fúngica en un elevado grado de pureza al laboratorio de la Dra. Marta Bruix, del Instituto de Química-Física Rocasolano (C.S.I.C.). Como resultado de estos estudios, se obtuvo la estructura en disolución de la HtA, con un RMSD de 0.98Å para todos los átomos del esqueleto polipeptídico. El plegamiento global de la proteína resultó ser muy similar al de las ribotoxinas estructuralmente caracterizadas, aunque se aprecian diferencias en el ordenamiento de los bucles de estructura aperiódica y en las posiciones relativas de algunos residuos del centro activo. Esta estructura se utilizará más adelante para discutir los resultados aquí expuestos en términos de la posible implicación de determinados residuos y regiones de la HtA en sus diferentes funciones.

4. Caracterización de la actividad ribonucleolítica de la hirsutelina fúngica y recombinante

El estudio de la actividad ribonucleolítica de la HtA tiene también como objetivo principal la búsqueda de semejanzas y diferencias con las ribotoxinas, de modo que se puedan asignar funciones a las diferentes zonas de la molécula en conjunción con la caracterización estructural llevada a cabo. Por ello, se ensayó la actividad enzimática de la HtA sobre diferentes sustratos que habían resultado previamente de utilidad en la caracterización de la actividad de las ribotoxinas: 1) homopolinucleótidos sintéticos, como el poli(A) o el poli(C); 2) ribosomas eucariotas aislados; 3) oligonucleótidos sintéticos que mimetizan la secuencia y estructura del lazo sarcina/ricina; y 4) dinucleósidos fosfato, como sustratos inespecíficos que permitieran obtener los parámetros cinéticos de la actividad ribonucleolítica estudiada. Por último, se analizó asimismo la acción de la HtA sobre células de rhabdomiosarcoma humano.

4.1. Zimogramas de actividad frente a polinucleótidos. Como una primera aproximación a la caracterización de la actividad ribonucleolítica de la HtA, se estudió el efecto de sus formas fúngica y recombinante sobre distintos hetero y homopolinucleótidos. Para ello, se desarrollaron zimogramas de actividad sobre distintos sustratos (RNA total, poli(A), poli(C), poli(G), poli(I) y poli(U)). La aplicación de los zimogramas a la detección de ribonucleasas resulta a la vez muy útil como criterio de pureza, por cuanto permiten determinar, además de la cantidad de enzima presente, su homogeneidad o su posible contaminación por actividades similares, aunque estén presentes en muy pequeña proporción. Esto es especialmente importante en el caso de las ribotoxinas en lo que concierne a pequeñas contaminaciones por otras RNasas menos específicas pero generalmente mucho más activas frente a RNA.

Como puede observarse en la *Figura 22*, se detectó actividad por parte de las formas fúngica y recombinante de HtA sobre el extracto de RNA total de *Torula*. En cuanto a los ensayos con homopolinucleótidos, los resultados más significativos se obtuvieron con poli(A) y poli(C). Así, se encontró una ausencia total de actividad sobre el primero por parte de las dos formas purificadas de la proteína, mientras que el poli(C) se reveló como el sustrato cuya degradación se observaba de modo más apreciable (*Figura 22*). Este comportamiento supone una diferencia con respecto a la α -sarcina, RNasa específica de purinas para la cual el poli(A) es uno de sus mejores sustratos homopoliméricos, mientras que el poli(C) resulta resistente a su acción (Endo *et al.*, 1983).

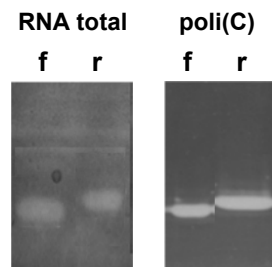


Figura 22. Zimogramas de actividad frente a polinucleótidos. Se muestra la actividad de 1 μ g de HtA fúngica (f) y recombinante (r) sobre el extracto de RNA total de *Torula* y el homopolinucleótido poli(C), en ambos casos a pH 7'0.

4.2. Actividad ribonucleolítica frente a ribosomas eucariotas. Con el fin de comprobar el efecto sobre ribosomas completos de la actividad ribonucleolítica encontrada para la HtA, se llevaron a cabo ensayos de degradación de ribosomas procedentes de lisados de reticulocitos de conejo. La *Figura 23* muestra los resultados de estos experimentos, de los cuales se deduce que la HtA, tanto en su forma fúngica como recombinante, reproduce la acción de las ribotoxinas, provocando la liberación del fragmento α característico de la acción de las proteínas de la familia de la α -sarcina sobre este tipo de sustrato. La cuantificación de las bandas del gel reveló además que la actividad de la HtA es alrededor de dos veces más alta que la de la α -sarcina.

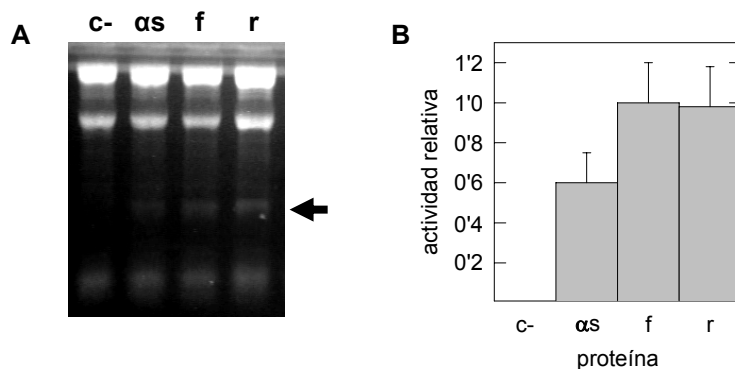


Figura 23. Ensayo de actividad ribonucleolítica sobre ribosomas eucariotas. Se muestra la actividad de 100ng de α -sarcina (αs), HtA fúngica (f) y HtA recombinante (r) a pH 7'0, junto con un control en ausencia de proteína (c-). La actividad específica de las ribotoxinas se detecta por la liberación del fragmento α , indicado por la flecha (A). B: Las actividades se expresan en relación al máximo determinado para la HtA y son el promedio de tres determinaciones.

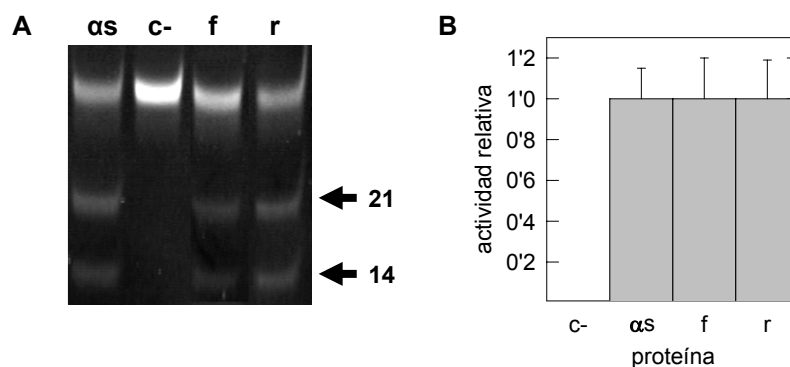


Figura 24. Ensayo de actividad ribonucleolítica sobre el oligonucleótido SRL. Se muestra la actividad de 100ng de α -sarcina (αs), HtA fúngica (f) y HtA recombinante (r) a pH 7'0, junto con un control en ausencia de proteína (c-). A: Las dos flechas indican la posición de los fragmentos de 21 y 14 nucleótidos resultantes del corte específico de un único enlace fosfodiéster. B: Las actividades se expresan en relación al máximo determinado y son el promedio de tres determinaciones.

4.3. Actividad ribonucleolítica sobre el SRL. Una vez que se hubo comprobado la especificidad de acción de la HtA sobre ribosomas completos, se procedió a analizar su actividad sobre un sustrato que reprodujera lo más fielmente posible la zona concreta del ribosoma sobre la que actúan las ribotoxinas. Se ensayó así el efecto de las proteínas purificadas sobre un oligonucleótido sintético que reproduce la secuencia y estructura del lazo sarcina/ricina (SRL), comparando de nuevo el resultado con la acción de la α -sarcina. Como se puede observar en la *Figura 24*, tanto la HtA fúngica como la

recombinante se mostraron activas frente a este sustrato de 35 nucleótidos, provocando, al igual que las ribotoxinas, su escisión en dos fragmentos de 14 y 21 nucleótidos. La cuantificación de las bandas no permitió en este caso apreciar diferencias de actividad entre la HtA y la α -sarcina.

4.4. Actividad frente a dinucleósidos monofosfato. Ya se ha explicado en la introducción cómo los dinucleósidos monofosfato han resultado muy útiles en el estudio a nivel molecular del mecanismo catalítico de las ribotoxinas, a pesar de la baja eficacia que estas enzimas presentan sobre sustratos de este tipo. Con el fin, una vez más, de comparar el comportamiento de la HtA con el de las RNAsas fúngicas extracelulares conocidas, se ensayó su actividad sobre los dinucleósidos monofosfato ApA y CpC. En la *Figura 25 A* se muestran los perfiles de separación por HPLC de los productos de la reacción de la HtA sobre ambos sustratos. La integración de los picos obtenidos a diferentes concentraciones de sustrato y el ajuste de los datos al modelo de Michaelis-Menten permitieron obtener los parámetros cinéticos que se muestran en la parte *B* de la figura, en ambos casos similares a los previamente determinados para la α -sarcina, como se discutirá más adelante.

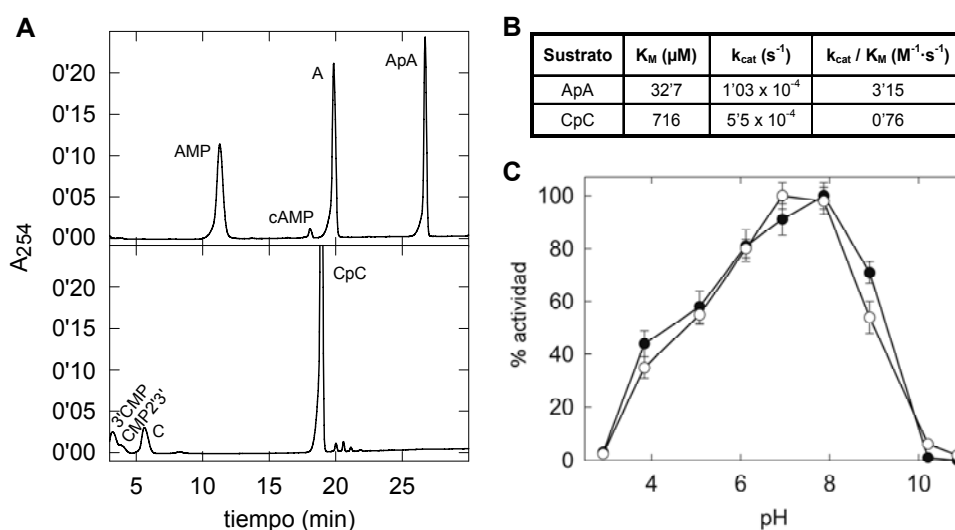


Figura 25. Actividad ribonucleolítica de la HtA sobre dinucleósidos monofosfato. **A:** Perfil de separación por HPLC de los productos de la reacción de degradación por parte la proteína de ApA (panel superior) y CpC (panel inferior), para una concentración de sustrato $80 \mu M$ y una concentración de enzima $4.5 \mu M$. **B:** Parámetros cinéticos de la actividad de la HtA sobre ApA y CpC, calculados a partir de la integración de los picos obtenidos midiendo absorbancia a 254nm (A_{254}) frente al tiempo a diferentes concentraciones de sustrato. **C:** Efecto del pH sobre la actividad ribonucleolítica ciclante de la HtA frente a ApA (círculos blancos) y CpC (círculos negros). La actividad se expresa como porcentaje respecto al valor máximo.

Teniendo en cuenta la dependencia que con respecto al pH muestra la actividad de las ribotoxinas, con curvas de actividad que difieren de unos miembros a otros, resultaba también interesante comprobar el efecto de este parámetro sobre la actividad ribonucleolítica de la HtA. Se determinó el perfil de actividad frente al pH para la reacción de degradación de ApA y CpC por parte de la HtA, usando en este caso cantidades saturantes de sustrato. El pH óptimo encontrado está entre 7 y 8 para la acción de la proteína sobre los dos dinucleósidos fosfato ensayados, aunque ambas curvas presentan un hombro alrededor de pH 5.

5. Estudios de interacción de la hirsutelina con fosfolípidos

Una de las principales diferencias entre las ribotoxinas y las RNasas de la familia T1 es la capacidad de las primeras para interaccionar con membranas, el paso a través de las cuales constituye además el factor limitante de la citotoxicidad. En el caso de la α -sarcina, se ha descrito su interacción con vesículas que presentan abundancia de fosfolípidos ácidos, sobre las que induce agregación, mezcla de lípidos y liberación de contenidos acuosos (Gasset *et al.*, 1994; Mancheño *et al.*, 1994a; Lacadena *et al.*, 2007). Por este motivo, se abordó el estudio de la capacidad de la HtA para interaccionar con membranas, utilizando en la mayoría de los casos vesículas fosfolipídicas como modelo.

5.1. Ensayos de agregación de vesículas. Las vesículas fosfolipídicas dispersan más luz cuando se encuentran formando agregados que cuando están libres, lo que permite analizar el proceso de agregación mediante el registro del incremento de absorbancia aparente a 360nm. La agregación de vesículas inducida por la α -sarcina supone un efecto muy representativo de la interacción de esta proteína con lípidos, cuyo estudio permitió además concluir que el proceso de agregación desencadenado por esta proteína depende de una primera

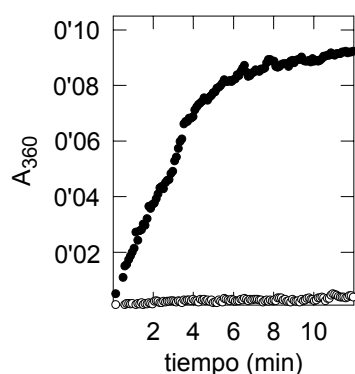


Figura 26. Efecto de la HtA y la α -sarcina sobre la agregación de vesículas de DMPG. Se muestra la evolución con el tiempo de la absorbancia aparente a 360nm tras la adición de HtA (círculos blancos) y α -sarcina (círculos negros).

etapa de formación de dímeros vesiculares, como se dedujo de estudios cinéticos (Mancheño *et al.*, 1994a). Se compararon los efectos de la HtA y de la α -sarcina sobre vesículas de DMPG, DMPC y DMPC:colesterol (1:1) a diferentes relaciones proteína/lípido. En ninguno de los casos se registró incremento alguno de absorbancia inducido por la adición de HtA a vesículas de fosfolípidos ácidos o neutros, los primeros de los cuales sí agregaban en presencia de α -sarcina (Figura 26).

5.2. Ensayos de liberación de contenidos acuosos. La Figura 27 refleja los resultados de los ensayos de permeabilización de vesículas de PG de huevo inducida por HtA, comparándolos de nuevo con los efectos de la α -sarcina. Se registró la liberación de contenidos acuosos según el ensayo basado en la dilución del par fluoróforo apagador ANTS-DPX. Como se puede observar, ambas proteínas perturban la barrera de permeabilidad de estas vesículas, siendo cuantitativamente mayor el efecto logrado con la HtA. Así, para una relación proteína/PG de 12×10^{-3} se alcanzó con la HtA una permeabilización del 60%, mientras que a la misma relación la α -sarcina no supera el 40% de liberación, considerando como el 100% el efecto lograda por el detergente Triton X-100.

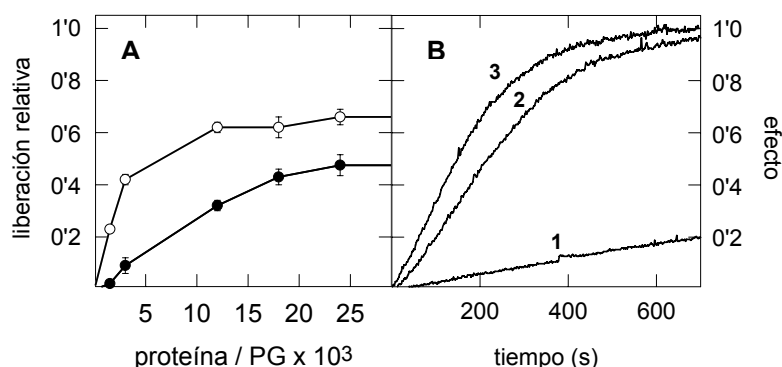


Figura 27. Ensayo de liberación de contenidos acuosos inducida por HtA (círculos blancos) y α -sarcina (círculos negros) (A). Se indica la liberación relativa a la conseguida con el detergente Triton X-100, considerando esta como 1'0. B: Cinéticas del efecto conseguido a diferentes relaciones molares proteína/PG: 1.5×10^{-3} (1), 12×10^{-3} (2) y 24×10^{-3} (3).

5.3. Ensayos de unión a vesículas. Después de haber comprobado el efecto de la HtA sobre vesículas de PG de huevo en cuanto a liberación de contenidos internos se refiere, se procedió a intentar valorar la unión de la proteína a estas vesículas y a otras de diferente composición (DMPG, DMPS y DMPC). Se pusieron a punto las condiciones del ensayo de manera que la totalidad de las vesículas sedimentara bajo la acción del campo centrífugo impuesto. Una vez encontradas estas condiciones, no se detectó disminución

alguna en la cantidad de proteína presente en los sobrenadantes tras ultracentrifugación de las muestras, resultantes de la incubación de la HtA con las diferentes vesículas a una relación molar proteína/lípido de 7×10^{-3} . Esta relación fue elegida a la vista de los resultados de los ensayos de permeabilización, por tratarse de aquella a la que se alcanzaba un efecto cerca del máximo sin encontrarse aún la proteína en exceso en cuanto al efecto observado.

5.4. Titulación con lípidos de los espectros de dicroísmo y fluorescencia. Otra forma de estudiar la interacción de la HtA con lípidos consiste en analizar el efecto de estos sobre los espectros de dicroísmo y fluorescencia de la proteína, con el fin de detectar posibles cambios conformacionales inducidos por la presencia de lípidos que pudieran tener reflejo a nivel espectroscópico. Así, se registraron ambos tipos de espectros tras incubación a 37°C de la proteína con cantidades crecientes de DMPG a relaciones proteína/lípido comprendidas entre 3×10^{-3} y 0,1. En ningún caso se observaron variaciones significativas en los espectros de fluorescencia o dicroísmo circular en el UV lejano de la HtA, ni siquiera tras adición de vesículas en relación saturante sobre la proteína según los ensayos de liberación de contenidos acuosos (Figura 28).

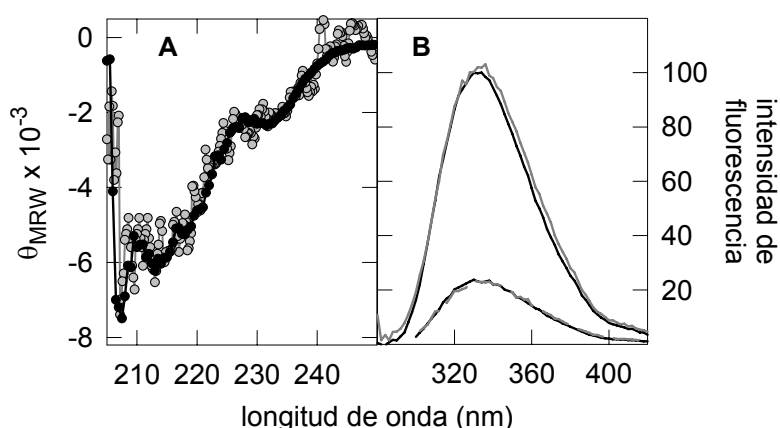


Figura 28. Espectros de dicroísmo circular y fluorescencia de la HtA en presencia de DMPG. Se muestran los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano (A) y fluorescencia (B) de la HtA en ausencia (negro) y presencia (gris) de vesículas de DMPG a la mayor cantidad de lípido ensayada (relación molar proteína/lípido = 3×10^{-3}).

5.5. Estudios de Calorimetría Diferencial de Barrido. Por medio de esta técnica se estudió la interacción con lípidos de la HtA desde dos puntos de vista. Por un lado, se analizó el efecto ejercido sobre el termograma de la HtA por PG de huevo en relación saturante según el ensayo de permeabilización

(relación molar proteína/lípido = 3×10^{-3}). Por otra parte, se estudió cómo afectaba la proteína a la transición térmica de vesículas de DMPG a una relación molar proteína/lípido de 24×10^{-3} , a la cual se había registrado el mayor efecto en los estudios de liberación de contenidos acuosos.

El efecto de PG sobre el termograma de HtA puede observarse en la *Figura 29*. La adición de este lípido a la relación ensayada provoca un desplazamiento en la temperatura media de la transición de la proteína, bajando esta desde 62°C a 60°C . La entalpía de la transición no se ve muy afectada, si bien parece observarse un ligero incremento en la misma (menor del 10%).

En lo que se refiere al efecto de la HtA sobre el termograma de DMPG, el experimento se realizó una vez más en comparación con la α -sarcina (*Figura 30*). La adición de HtA en relación molar lípido:proteína 42:1 supuso un desplazamiento de la T_m del lípido desde 23 a 25°C . Este cambio en la

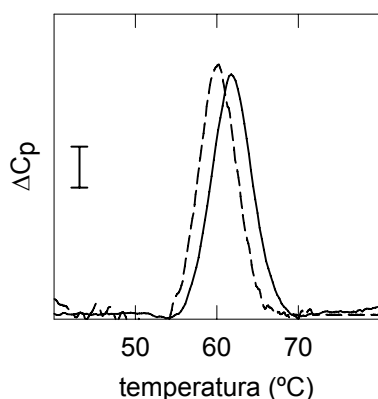


Figura 29. Efecto de PG sobre el termograma de HtA. Se muestran los termogramas de HtA en ausencia (línea continua) y presencia (línea discontinua) de PG en relación saturante (relación molar proteína/lípido = 3×10^{-3}). Los termogramas se registraron en tampón MOPS 50mM, NaCl 0.1M, EDTA 1mM, pH 7.0, a una velocidad de barrido de $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$. La barra a la izquierda del termograma representa una ΔC_p de $2 \text{ Kcal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$.

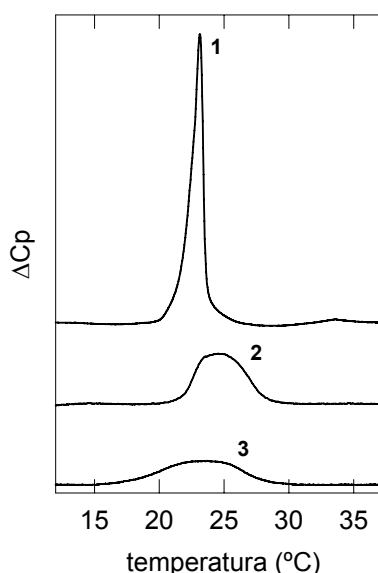


Figura 30. Efecto de la HtA y la α -sarcina sobre la transición térmica de vesículas de DMPG. Se muestran los termogramas del lípido en ausencia de proteína (1) y en presencia de HtA (2) y α -sarcina (3), ambas en relación molar proteína/lípido = 24×10^{-3} .

temperatura media de la transición viene acompañado por una disminución en torno al 30% de la entalpía asociada al proceso. En el caso de la α -sarcina, esta disminución alcanza alrededor del 40% cuando se añade la ribotoxina al lípido a la misma relación molar que la empleada en el caso de la HtA (*Figura 30*). La variación en la T_m es sin embargo menor para la α -sarcina, encontrándose un aumento de apenas 0'5°C en las condiciones descritas.

Estos resultados informan de la existencia de interacción entre la HtA y las vesículas de fosfolípidos ácidos. Con el fin de completar estos estudios y obtener información cuantitativa acerca del grado de dicha interacción y de los parámetros termodinámicos y cinéticos que la gobiernan, se abordó la caracterización de la unión de HtA a vesículas de DMPG haciendo uso de un calorímetro de titulación.

5.6. Estudios de Calorimetría de Titulación Isotérmica. Los estudios de titulación de la posible unión de HtA a vesículas de DMPG supusieron, en primer lugar, la puesta a punto de un aparato de ITC de reciente adquisición por parte del Departamento en el cual se ha desarrollado la presente Tesis. Posteriormente, y ya para el sistema objeto de estudio, fue necesario probar diferentes diseños experimentales encaminados a conseguir una buena recuperación de la línea base y una adecuada distribución e intensidad de los picos. En un primer momento, se trató de valorar la unión inyectando la proteína desde la jeringa sobre vesículas de DMPG contenidas en la celda calorimétrica a concentración 122 μ M. La concentración de proteína en la jeringa era de 21 μ M, con lo que al final de la titulación se tendría en la celda una relación molar HtA/DMPG superior a la que había permitido observar los efectos máximos en experimentos de permeabilización de vesículas. Sin embargo, los picos de inyección obtenidos presentaban una intensidad demasiado baja y no permitían extraer ninguna conclusión acerca de los parámetros de la unión. Tampoco se obtuvieron resultados aumentando la concentración de proteína en la jeringa hasta 55 μ M.

Con la idea de reproducir y completar en el calorímetro de titulación la caracterización de una unión de naturaleza semejante de la cual se tuvieran datos previos, se procedió a valorar la unión de α -sarcina a vesículas de DMPG. Se esperaba así disponer de un sistema que sirviera de referencia a la hora de escoger las condiciones más apropiadas para el estudio de la interacción que nos ocupaba. Las inyecciones de α -sarcina sobre DMPG dieron lugar a un conjunto de picos extraños que resultaron ser reflejo de fenómenos asociados a la unión, tales como la agregación inducida por la ribotoxina en cuestión sobre los lípidos utilizados. Estas anomalías consiguieron eliminarse invirtiendo las posiciones de la proteína y el lípido entre la jeringa y la celda. De este modo, con la inyección paulatina de DMPG sobre la proteína, se evitaba que existiera ya de inicio una población de vesículas en la celda que pudiera multiplicar los efectos de

cualquier fenómeno ajeno a la unión sobre los picos de titulación. Al ir creciendo poco a poco la cantidad de lípido en el interior de la celda, cualquiera de estos efectos se vería restringido a las vesículas presentes en el interior de la misma en cada momento y, por tanto, minimizado. Sin embargo, con este nuevo diseño experimental tampoco se consiguió obtener una buena curva de titulación de la unión de α -sarcina a vesículas de DMPG.

El hecho de que estas vesículas no agregaran en presencia de HtA invitó a hacer uso del nuevo esquema de inyección para el sistema objeto de estudio, por considerar que resultaría más sencillo optimizar en él las concentraciones de ambas especies que en el caso de la α -sarcina. Así, se procedió a inyectar ahora DMPG sobre HtA aumentando las concentraciones de ambas especies con respecto a los intentos iniciales para lograr una mayor intensidad de los picos. En todos los casos, se realizaron los controles pertinentes de calores de dilución para asegurar que los picos observados no se debían a ningún artefacto. Los resultados así obtenidos fueron satisfactorios en la medida en que permitieron obtener picos de intensidad adecuada. La posterior optimización del tiempo transcurrido entre inyecciones permitió además lograr una buena recuperación de la línea base, lo que resulta fundamental para la correcta integración de las áreas (*Figura 31*). No se ha conseguido aún distribuir las inyecciones de modo que desprendan una curva de titulación completamente saturada y simétrica que permita extraer conclusiones cuantitativamente exactas acerca de los parámetros de la unión. Sin embargo, sí se está en disposición de afirmar que se trata de una unión de baja afinidad ($K_a < 10^4 \text{ M}^{-1}$), gobernada posiblemente por interacciones meramente electrostáticas.

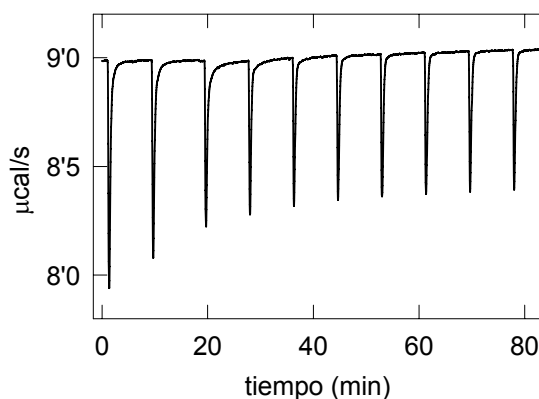


Figura 31. Picos obtenidos de la inyección de vesículas de DMPG sobre HtA en un calorímetro de titulación. Se emplearon unas concentraciones de 30mM de lípido en la jeringa y 0'14mM de proteína en la celda. El tiempo transcurrido entre inyecciones fue de 500s y la temperatura de la celda se mantuvo a 37°C.

6. Estudio del efecto de la hirsutelina sobre células eucariotas

El carácter citotóxico de las ribotoxinas es, junto con la alta especificidad que exhiben en su acción ribonucleolítica, la cualidad que mejor las diferencia de las RNasas inespecíficas de la familia T1. Una vez confirmada la actividad ribonucleolítica específica de la HtA, el estudio de su acción sobre células transformadas constituía, por tanto, un paso necesario en su estudio comparativo con la familia de las ribotoxinas. Por otra parte, la actividad insecticida adjudicada desde el principio a la HtA invitó a la comparación de su acción sobre líneas celulares de insecto con la ejercida por la α -sarcina, con el interés adicional de que estos estudios pudieran abrir una nueva vía de exploración de la función biológica de las ribotoxinas, hoy por hoy desconocida.

6.1. Ensayos de citotoxicidad sobre células de rhabdomiosarcoma. La acción citotóxica de la α -sarcina sobre células de rhabdomiosarcoma humano ha sido ampliamente estudiada (Turnay *et al.*, 1993; Olmo *et al.*, 2001; García-Ortega *et al.*, 2002). El potencial carácter tóxico de la HtA fue analizado, por tanto, estudiando sus efectos sobre este tipo de células transformadas. Para ello, la acción de las variantes fúngica y recombinante de la HtA fue comparada con los efectos de la α -sarcina sobre la línea celular RD, en términos de inhibición de la biosíntesis de proteínas.

Los resultados obtenidos con la forma fúngica de HtA fueron totalmente coincidentes con los de la α -sarcina (Figura 32). En ambos casos, la concentración necesaria para lograr el 50% de inhibición de la biosíntesis de proteínas (IC_{50}) resultó ser de $1\mu M$. La variante recombinante de la proteína objeto de estudio mostró valores ligeramente superiores de IC_{50} (en torno a $5\mu M$), lo que se adjudica en parte a la presencia de la extensión de histidinas en su extremo aminoterminal.

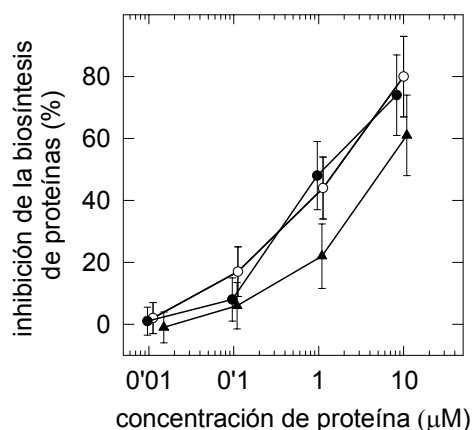


Figura 32. Inhibición de la biosíntesis de proteínas provocada por la HtA en células de rhabdomiosarcoma. Se muestran los porcentajes de inhibición de la biosíntesis proteica logrados a diferentes concentraciones de α -sarcina (círculos negros), HtA fúngica (círculos blancos) y HtA recombinante (triángulos), después de 18 horas de incubación. Los resultados se expresan como porcentajes respecto a muestras control en ausencia de toxina y son el promedio \pm S.D. de tres determinaciones independientes con dos muestras diferentes.

6.2. Ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares de insecto. La toxicidad de la HtA sobre diferentes especies de insectos y ácaros ha sido descrita en varias ocasiones (Liu *et al.*, 1995; Mazet y Vey, 1995; Omoto y McCoy, 1998). Después de confirmarse su similitud en numerosos aspectos con los miembros de la familia de las ribotoxinas, se decidió abordar el estudio de la posible acción de estas sobre células de insecto. Se compararon con este fin los efectos de HtA y α -sarcina sobre las líneas celulares High Five (*Trichoplusia ni*) y Sf9 (*Spodoptera frugiperda*).

Las Figuras 33 y 34 muestran los efectos de las dos proteínas sobre células High Five. Tanto la α -sarcina como la HtA resultaron tóxicas para esta línea celular, incluso a bajas concentraciones, encontrándose un 20% de células muertas a $0.001 \mu\text{M}$ de proteína. La cantidad de toxina necesaria para conseguir un 50% de muerte celular (IC_{50}) se estimó en este caso en torno a $0.025 \mu\text{M}$ para la HtA y $0.1 \mu\text{M}$ para la α -sarcina. La citotoxicidad a concentración $1 \mu\text{M}$ alcanzó prácticamente el 100% en ambos casos.

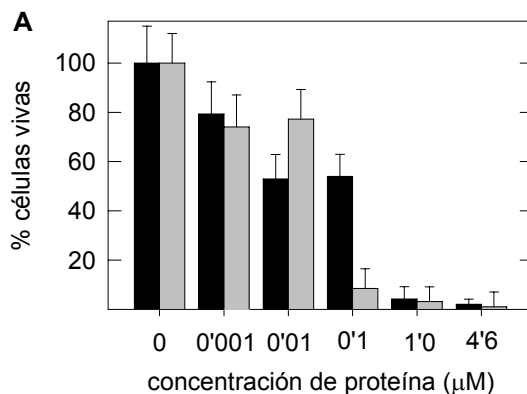
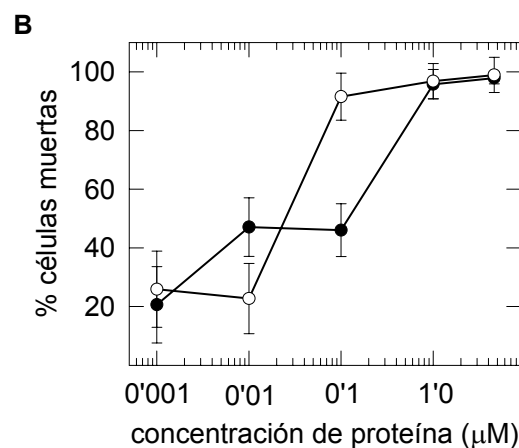


Figura 33. Citotoxicidad de HtA y α -sarcina sobre células High Five.

A: Porcentaje de células vivas al cabo de 60 horas desde la adición de distintas cantidades de α -sarcina (negro) y HtA (gris). Los resultados se expresan como porcentajes respecto a muestras control en ausencia de toxina y son el promedio \pm S.D. de dos determinaciones independientes.



B: Los resultados se transformaron a porcentaje de células muertas para el cálculo de la concentración necesaria para lograr un 50% de muerte celular (IC_{50}) en el caso de la α -sarcina (círculos negros) y la HtA (círculos blancos). Los resultados se expresan como porcentajes respecto a muestras control en ausencia de toxina y son el promedio \pm S.D. de dos determinaciones independientes.

CÉLULAS HIGH FIVE

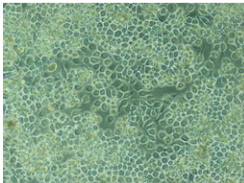
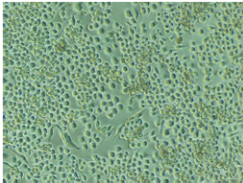
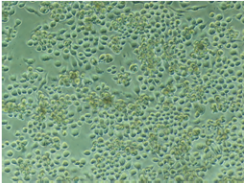
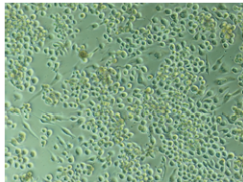
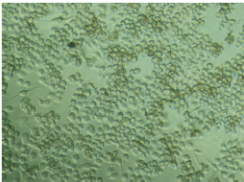
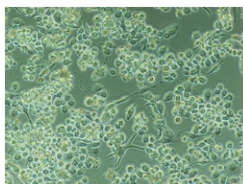
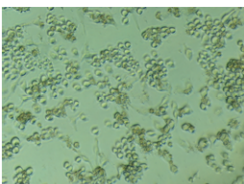
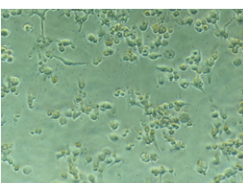
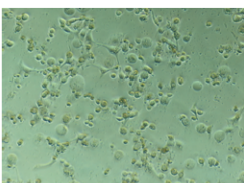
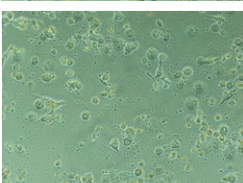
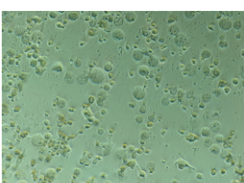
Control	α -Sarcina	Hirsutelina	Concentración de proteína (μ M)
			0'001
			0'01
			0'1
			1'0
			4'6

Figura 34. Acción de la α -sarcina y la HtA sobre células High Five. Se muestran los efectos ejercidos por α -sarcina y HtA a distintas concentraciones sobre un cultivo de células High Five (*Trichoplusia ni*) en el medio Insect X-Press. Las fotografías fueron tomadas al cabo de 60 horas tras la adición de la proteína. A la izquierda se muestra un control en ausencia de proteína.

CÉLULAS Sf9

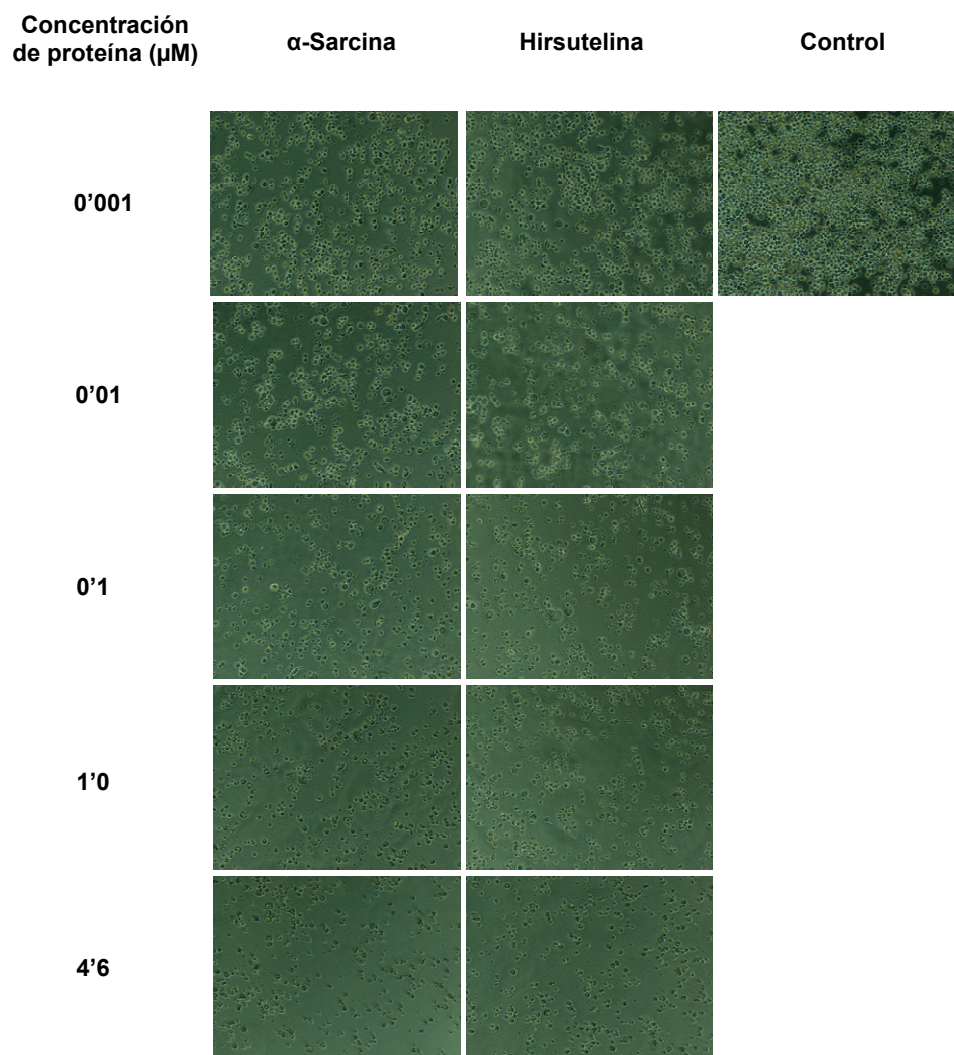


Figura 35. Acción de la α-sarcina y la HtA sobre células Sf9. Se muestran los efectos ejercidos por α-sarcina y HtA a distintas concentraciones sobre un cultivo de células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) en el medio Insect X-Press. Las fotografías fueron tomadas al cabo de 60 horas tras la adición de la proteína. A la izquierda se muestra un control en ausencia de proteína.

En el caso de células Sf9, los resultados obtenidos fueron de nuevo similares para las dos proteínas ensayadas (Figuras 35 y 36). Tanto la α -sarcina como la HtA resultaron tóxicas frente a la línea celular de *Spodoptera frugiperda*, consiguiendo un 20% de muerte celular ya a $0.001 \mu\text{M}$ de proteína. Los valores de IC_{50} en este caso estuvieron entorno a $0.01 \mu\text{M}$ para ambas toxinas y su acción citotóxica alcanzó el 100% a concentraciones cercanas a $0.1 \mu\text{M}$.

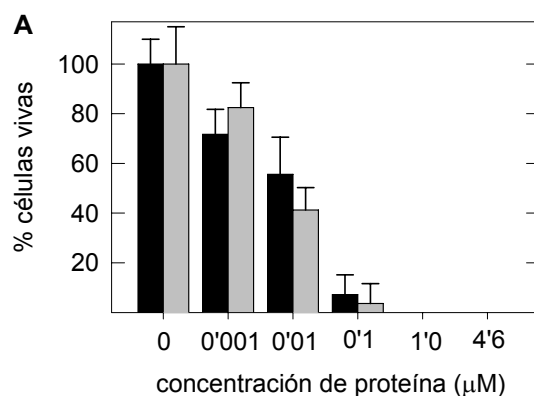
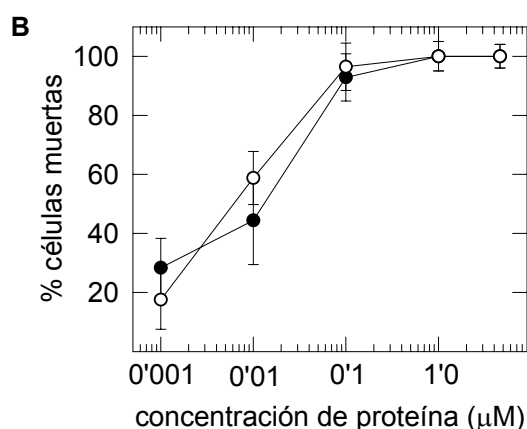


Figura 36. Citotoxicidad de HtA y α -sarcina sobre células Sf9.

A: Porcentaje de células vivas al cabo de 60 horas desde la adición de distintas cantidades de α -sarcina (negro) y HtA (gris). Los resultados se expresan como porcentajes respecto a muestras control en ausencia de toxina y son el promedio \pm S.D. de dos determinaciones independientes.



B: Los resultados se transformaron a porcentaje de células muertas para el cálculo de la concentración necesaria para lograr un 50% de muerte celular (IC_{50}) en el caso de la α -sarcina (círculos negros) y la HtA (círculos blancos). Los resultados se expresan como porcentajes respecto a muestras control en ausencia de toxina y son el promedio \pm S.D. de dos determinaciones independientes.

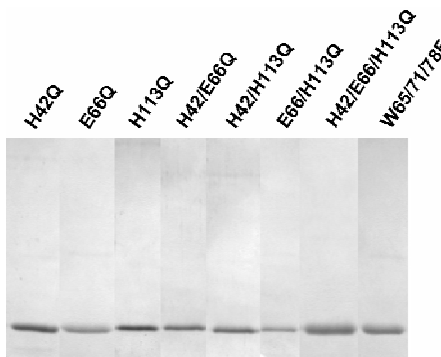
7. Obtención y caracterización de mutantes de la hirsutelina

Después de la exhaustiva caracterización de la HtA, tanto en lo que se refiere a los aspectos estructurales como a los funcionales, y la comparación con otras ribotoxinas, se procedió a la obtención de formas mutantes que permitieran explorar la implicación de ciertos residuos en el centro activo de la proteína. La elección de los aminoácidos a mutar se llevó a cabo mediante análisis del

alineamiento de la secuencia de la HtA con las de otras ribotoxinas cuyos centros activos son bien conocidos (*Figura 12*), dado que se carecía entonces de la estructura tridimensional en solución que se obtendría más tarde gracias a los estudios de RMN. De este modo, los residuos que se consideraron como candidatos a formar parte del centro activo de la HtA con mayor probabilidad fueron His 42, Glu 66 e His 113. Todos ellos fueron sustituidos por glutamina sometiendo el plásmido pTacTacHtA, que contenía la secuencia original, al proceso de mutagénesis por extensión del solapamiento descrito en el apartado de *Métodos*. Del mismo modo, se partió posteriormente de las secuencias de los mutantes individuales así obtenidas para conseguir dobles mutantes en todas las combinaciones posibles (H42/E66Q, H42/H113Q y E66/H113Q) y, en último término, se logró de forma análoga la mutación triple H42/E66/H113Q. Siguiendo idéntico procedimiento, se obtuvo el mutante triple de los triptófanos situados en las posiciones aparentemente próximas 65, 71 y 78 (potencial bucle 3 de la HtA), no sólo por considerarlos de interés en la estructura y por tanto en la actividad de la proteína, sino también por la posibilidad de explorar en un futuro la implicación en la interacción con lípidos de zonas de naturaleza hidrofóbica. En todos los casos fue necesario subclonar los fragmentos finales de PCR en el plásmido pCR®-Blunt II-TOPO®, según las instrucciones del kit comercial Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen). Esto permitió obtener resultados mucho mejores en la posterior clonación de los genes mutados en el plásmido pTacTacHtA, sustituyendo el gen original tras digestión en las dianas EcoRI y NdeI. Las diferentes formas mutadas del plásmido pTacTacHtA así obtenidas fueron empleadas para la posterior producción y purificación de las correspondientes variantes de sustitución de la proteína.

7.1. Producción y purificación de mutantes de hirsutelina. Se siguió para todas las formas mutantes idéntico procedimiento al descrito para la producción y purificación de la HtA recombinante en las condiciones óptimas encontradas. El patrón de bandas en los diferentes pasos de la purificación de las diferentes variantes fue idéntico al descrito para la HtA con su secuencia original. El rendimiento se mantuvo igualmente en torno a los 0'25mg/litro de cultivo en la mayoría de los casos, a excepción del mutante E66/H113Q, para el que no fue posible superar los 0'15mg/litro de cultivo. Sin embargo, estos rendimientos y el elevado grado de pureza logrado para todos los mutantes ($\geq 99\%$, según se determinó por densitometría de los geles correspondientes a los lotes finales) permitieron disponer de proteína para su posterior caracterización (*Figura 37*). La presencia de las distintas variantes de HtA en las diferentes muestras se confirmó por *Western Blot*, utilizando tanto anticuerpos monoclonales frente a la HtA como anticuerpos comerciales frente a la extensión de histidinas.

Figura 37. Electroforesis en PAGE-SDS de los lotes finales obtenidos tras la purificación de diferentes formas mutantes de HtA.



7.2. Espectros de dicroísmo circular. Se registraron los espectros de dicroísmo circular en la región del UV-lejano de todos los mutantes purificados. Los espectros obtenidos fueron en todos los casos coincidentes con el de la proteína sin mutar, con la única excepción del correspondiente al mutante W65/71/78F, que presentaba una variación en el hombro observado en torno a 230nm, adjudicable a la ausencia de los tres residuos aromáticos. Se consideró por tanto que todas las variantes de sustitución conservaban la estructura global de la proteína con la secuencia original, lo que permitiría discutir los resultados obtenidos en su futura caracterización funcional en términos de la implicación de los residuos mutados en la actividad de la proteína. Estos espectros, junto con los de absorción y los resultados de análisis de aminoácidos permitieron determinar los coeficientes de extinción de las proteínas mutantes purificadas. Para la mayoría de ellas, $E^{0.1\%}_{280\text{nm}}$ (280nm, 1cm) mantuvo el valor de 2'0 previamente determinado para la proteína sin mutar. En el caso del mutante de triptófanos, el valor de $E^{0.1\%}_{280\text{nm}}$ (280nm, 1cm) resultó ser de 0'9.

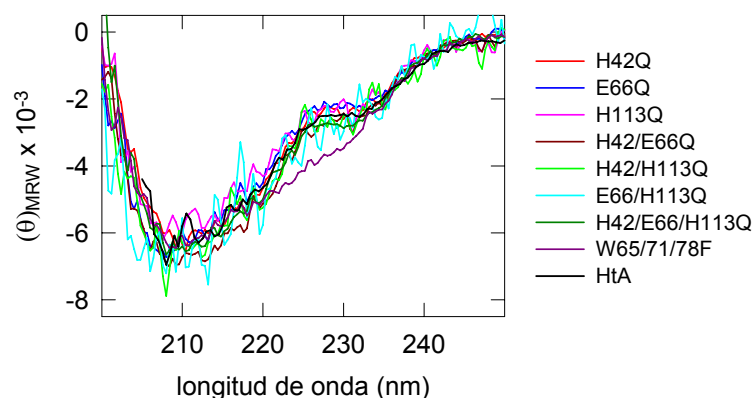


Figura 38. Espectros de dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano de distintas formas mutantes de la HtA. A la derecha se indica el código de colores empleado para cada uno de los mutantes. En negro, el espectro de la HtA sin mutar. $(\theta)_{\text{MRW}}$ (elipticidad molar por residuo) está expresada en unidades de $\text{grado} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$.

7.3. Actividad ribonucleolítica frente a ribosomas eucariotas. Como una primera aproximación al estudio del efecto de las mutaciones introducidas en la actividad de la HtA, se ensayó la acción de las proteínas mutantes purificadas sobre ribosomas procedentes de lisado de reticulocitos de conejo. En la *Figura 39* se puede observar cómo todos los mutantes individuales conservan, en mayor o menor medida, actividad ribonucleolítica específica, produciendo liberación del fragmento α . Sin embargo, cualitativamente el mutante E66Q exhibe una actividad idéntica a la de HtA sin mutar, mientras que los dos mutantes individuales de histidina resultan menos activos. La pérdida de actividad es total en el caso de los mutantes dobles y el triple mutante H42/E66/H113Q. Por otra parte, la sustitución de los triptófanos en las posiciones 65, 71 y 78 por fenilalanina no parece afectar a la actividad de la HtA.

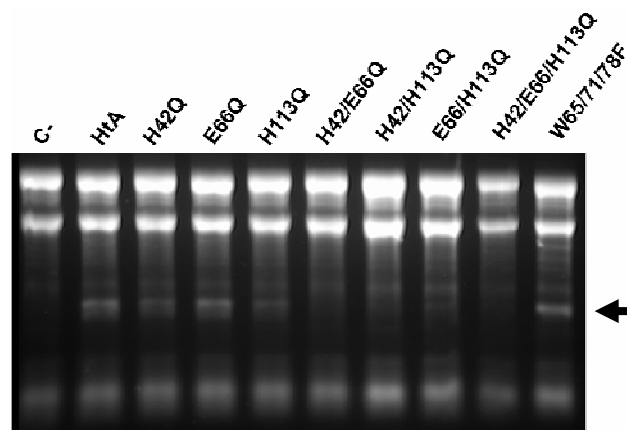


Figura 39. Ensayo de actividad ribonucleolítica de diferentes formas mutantes de HtA sobre ribosomas eucariotas. Se muestra la actividad de 100ng de HtA y cada uno de sus mutantes a pH 7'0, junto con un control en ausencia de proteína (c-). La posición del fragmento α aparece indicada por una flecha.

7.4. Actividad ribonucleolítica sobre el SRL. Una vez que se hubo analizado la acción de los mutantes de HtA sobre ribosomas completos, se procedió a estudiar su efecto sobre el oligonucleótido sintético SRL, que reproduce la secuencia y estructura del lazo sarcina/ricina, diana principal dentro de la estructura del ribosoma de la acción de las ribotoxinas. Como se puede comprobar en la *Figura 40*, ninguna de las proteínas mutantes purificadas presenta actividad frente a este sustrato. Las concentraciones de sustrato y proteína en estos ensayos fueron de 2 μ M y 1 μ M, respectivamente.

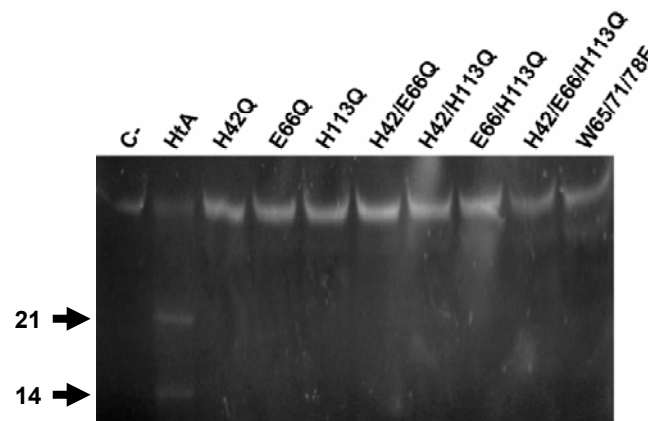


Figura 40. Ensayo de actividad ribonucleolítica de diferentes formas mutantes de HtA sobre el oligonucleótido SRL. Se muestra la actividad de 100ng de HtA y cada uno de sus mutantes a pH 7'0, junto con un control en ausencia de proteína (c-). Las dos flechas indican la posición de los fragmentos de 21 y 14 nucleótidos resultantes del corte específico de un único enlace fosfodiéster.

7.5. Citotoxicidad sobre células de rhabdomiosarcoma. La caracterización funcional de todos los mutantes purificados se completó en último término con la comparación de su efecto sobre células de rhabdomiosarcoma con el de la proteína sin mutar. En la *Figura 41* se puede ver el porcentaje de inhibición de la biosíntesis de proteínas logrado con de cada una de las variantes en comparación con la acción de la HtA con su secuencia original, todas ellas a una concentración 1 μ M (en torno al IC₅₀ determinado para la HtA). Se observa que la actividad decrece considerablemente en todos los

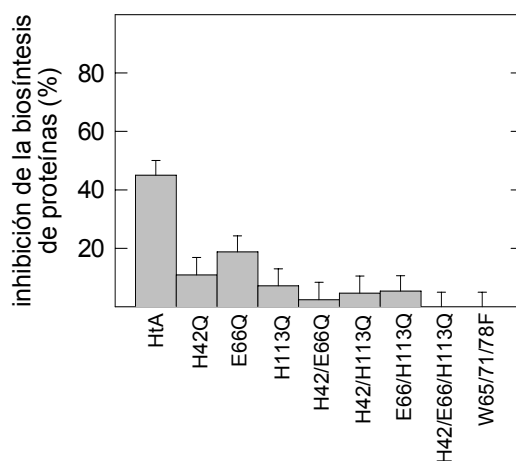


Figura 41. Inhibición de la biosíntesis de proteínas provocada por la HtA y diferentes mutantes en células de rhabdomiosarcoma. Se muestran los porcentajes de inhibición de la biosíntesis proteica logrados a concentración 1 μ M de HtA y sus distintos mutantes después de 18 horas de incubación. Los resultados se expresan como porcentajes respecto a muestras control en ausencia de toxina y son el promedio \pm S.D. de tres determinaciones independientes.

mutantes individuales, si bien E66Q retiene aproximadamente la mitad de la capacidad inhibitoria de la HtA sin mutar. El descenso de actividad es drásticamente más acusado en los mutantes dobles y prácticamente total en los mutantes triples H42/E66/H113Q y W65/71/78F. Para estas dos últimas variantes se muestra en la *Figura 42* el efecto conseguido a diferentes concentraciones, demostrándose que la pérdida de citotoxicidad es completa en el intervalo 0'5-10 μ M, especialmente en el caso del mutante de triptófanos.

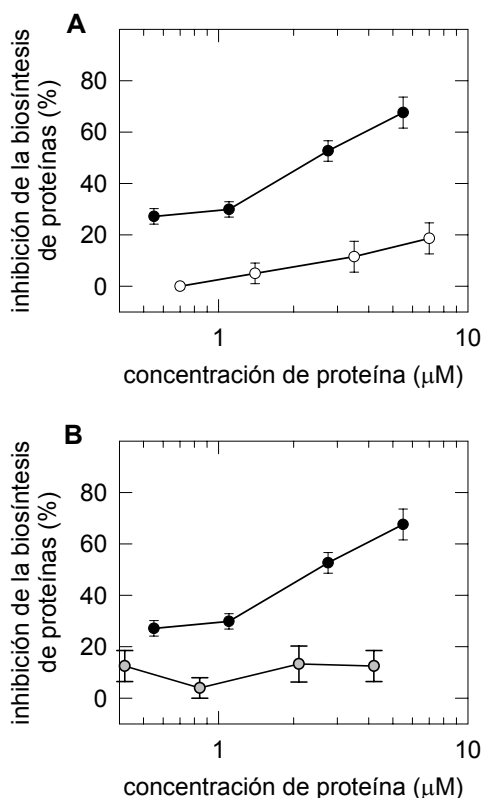


Figura 42. Inhibición de la biosíntesis de proteínas provocada por la HtA y los mutantes H42/E66/H113Q y W65/71/78F en células RD.

A: Porcentajes de inhibición de la biosíntesis proteica logrados a diferentes concentraciones de HtA (círculos negros) y su mutante H42/E66/H113Q (círculos blancos), después de 18 horas de incubación. Los resultados se expresan como porcentajes respecto a muestras control en ausencia de toxina y son el promedio \pm S.D. de tres determinaciones independientes.

B: Porcentajes de inhibición de la biosíntesis proteica logrados a diferentes concentraciones de HtA (círculos negros) y su mutante W65/71/78F (círculos blancos), después de 18 horas de incubación. Los resultados se expresan como porcentajes respecto a muestras control en ausencia de toxina y son el promedio \pm S.D. de tres determinaciones independientes.

DISCUSIÓN

Las ribonucleasas extracelulares destacan dentro de la amplia familia de proteínas con actividad ribonucleolítica gracias a los numerosos estudios realizados acerca de su potencial aplicación biomédica. Entre ellas, las ribotoxinas resultan a su vez de particular interés por presentar una serie de características únicas, tales como su citotoxicidad y especificidad de acción, que las diferencian incluso de otras ribonucleasas con las que guardan una estrecha relación estructural y filogenética, como es el caso de las pertenecientes a la familia de la RNasa T1 (Lacadena *et al.*, 2007; Carreras-Sangrà *et al.*, 2008; Herrero-Galán *et al.*, 2008b).

La hirsutelina A fue inicialmente descrita como una micotoxina con actividad insecticida producida por el hongo entomopatógeno *Hirsutella thompsonii* (Liu *et al.*, 1995; Mazet y Vey, 1995). Los primeros análisis realizados sobre su secuencia aminoterminal y su cDNA no permitieron encontrar homologías significativas con ninguna proteína conocida (Liu *et al.*, 1996; Boucias *et al.*, 1998). Sin embargo, un análisis detallado de su secuencia de aminoácidos reveló la existencia de un 25% de identidad con los principales miembros de la familia de las ribotoxinas (Martínez-Ruiz *et al.*, 1999b). Los resultados obtenidos en la presente Tesis han permitido demostrar que la HtA exhibe actividad ribonucleolítica frente a dinucleósidos monofosfato, polirribonucleótidos, oligonucleótidos sintéticos que mimetizan la secuencia y estructura del SRL y ribosomas completos, produciendo en estos últimos la liberación del fragmento α característico de la acción de las ribotoxinas. Además, la HtA es capaz de interaccionar con membranas y penetrar en las células, resultando citotóxica frente a líneas tumorales humanas por inhibición de la biosíntesis de proteínas. Con todo ello, queda más que justificada la conclusión de que la HtA es un nuevo miembro de la familia de las ribotoxinas.

Por otra parte, la HtA exhibe asimismo considerables similitudes con las RNasas inespecíficas de la familia T1 (100-110 aminoácidos), resultando la ribotoxina más cercana en tamaño a ellas (130 aminoácidos, frente a los 149/150 de las otras ribotoxinas conocidas). Este hecho incrementa el interés de su estudio, no sólo en lo que a aspectos evolutivos se refiere, sino por cuanto puede aportar a la inferencia de relaciones estructura-función en la familia de las ribotoxinas, al englobar todas las características funcionales conocidas de estas en una estructura de menor tamaño. En este sentido, resultarán muy útiles los diferentes mutantes producidos y otros mutantes y quimeras que se puedan diseñar y obtener en el futuro. De forma adicional, los estudios comparativos del carácter citotóxico de la HtA y la α -sarcina sobre células de insecto abren una nueva vía de exploración de la función biológica de las ribotoxinas, que permanece hasta hoy desconocida, además de invitar a analizar su acción sobre ribosomas pertenecientes a diferentes especies.

Los resultados incluidos en esta memoria se prestan, por tanto, a ser discutidos desde el doble punto de vista de las relaciones estructura-función en las ribotoxinas y la evolución y posible función biológica de estas proteínas. Por último, se analizarán las perspectivas de futuro que se abren en la investigación y posible aplicación biomédica de esta interesante familia de proteínas.

Relaciones estructura-función en la familia de las ribotoxinas

El estudio de las relaciones estructura-función en la familia de las ribotoxinas ha despertado gran interés desde su descubrimiento. Su 25% de homología de secuencia con las RNasas de la familia T1, junto con su elevada similitud estructural, sobre todo en lo que se refiere al núcleo principal de hebras β que incluye al centro activo, hace que ambas familias sean consideradas como miembros de un mismo grupo de ribonucleasas (Aravind y Koonin, 2001). Sin embargo, las ribotoxinas resultan únicas dentro de esta superfamilia a causa de su mayor tamaño (alrededor de cuarenta aminoácidos adicionales), su basicidad y su elevada especificidad de acción, junto con su carácter citotóxico derivado de la capacidad de interaccionar con membranas (Lacadena *et al.*, 2007; Herrero-Galán *et al.*, 2008a). Desde un punto de vista estructural, las principales diferencias con respecto a las RNasas del tipo T1 radican en la longitud y ordenamiento de los bucles de estructura aperiódica y el extremo aminoterminal, elementos que son consecuentemente considerados como determinantes de las actividades extra de las ribotoxinas.

Características estructurales. La producción, purificación y caracterización de HtA fúngica y recombinante ha permitido comprobar que ambas formas de la proteína resultan indistinguibles en su conformación y

actividad. El análisis de su estructura secundaria a través de medidas de dicróismo circular en el UV-lejano corrobora la predominancia de estructura tipo β en la HtA, como corresponde a las RNAsas de las familias T1 y de las ribotoxinas. Este hecho está de acuerdo con las predicciones basadas en la similitud de secuencia de la HtA con ambos grupos de proteínas (Figura 12). Según el mismo análisis, cuatro de las hebras β de la α -sarcina (β_1 a β_4) pueden ser fácilmente predichas para la HtA (Figura 44 A). Los residuos de la hélice α de la α -sarcina presentan un parámetro medio helicoidal (Chou y Fasman, 1978) de 1'05, y este valor es de 1'21 para los aminoácidos equivalentes en la HtA (Figura 44 A). La mayoría de los bucles de estructura aperiódica de la α -sarcina muestran perfiles de hidrofilia muy similares a las correspondientes regiones de la secuencia de la HtA, a excepción del bucle 2, que no puede ser reconocido por completo en esta proteína por ser mucho más corta en esa zona (Figura 44 B).

A

proteína	β_1	P_β	β_2	P_β	β_3	P_β	β_4	P_β	β_5	P_β
α -sarcina	50HWF52	1.21	94LLEF97	1.09	120ARVY124	1.31	133GIHT138	1.14	140E--LKL143	0.93
HtA	42HRY44	1.09	64LWEY67	1.13	94IRVY98	1.48	109GVMTHS114	1.05	123KEFFEK128	0.83

proteína	α -hélice	P_α
α -sarcina	27QNKAESNSHHA37	1.05
HtA	21VATAQAQARKA31	1.21

B

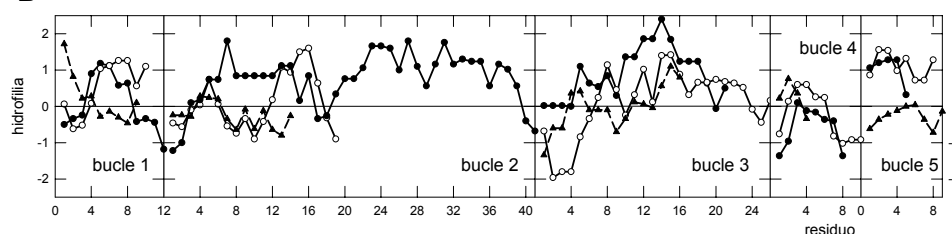


Figura 44. A: Alineamiento y predicciones de estructura para las potenciales regiones de estructura secundaria ordenada de la HtA. Las propensiones de estructura secundaria fueron calculadas de acuerdo a los parámetros de referencia de Jennings *et al.*, (1965). P_α y P_β son las propensiones medias de las regiones correspondientes. **B:** Perfiles de hidrofilia de los bucles de α -sarcina (círculos negros) y las regiones correspondientes de HtA (círculos blancos) y RNasa T1 (triángulos).

En lo que se refiere a la característica horquilla β aminoterminal de las ribotoxinas, la secuencia de la HtA es mucho más corta en esa zona, pero se puede predecir para esta proteína un motivo estructural similar (Figura 45 A y B). La potencial horquilla β de la hirsutelina presentaría un tamaño intermedio entre la de la α -sarcina y la de la RNasa T1, mucho más corta. Además, el perfil de hidrofilia predicho para los residuos de la HtA localizados en esa región resulta similar al de los aminoácidos equivalentes en la α -sarcina (Figura 45 C).

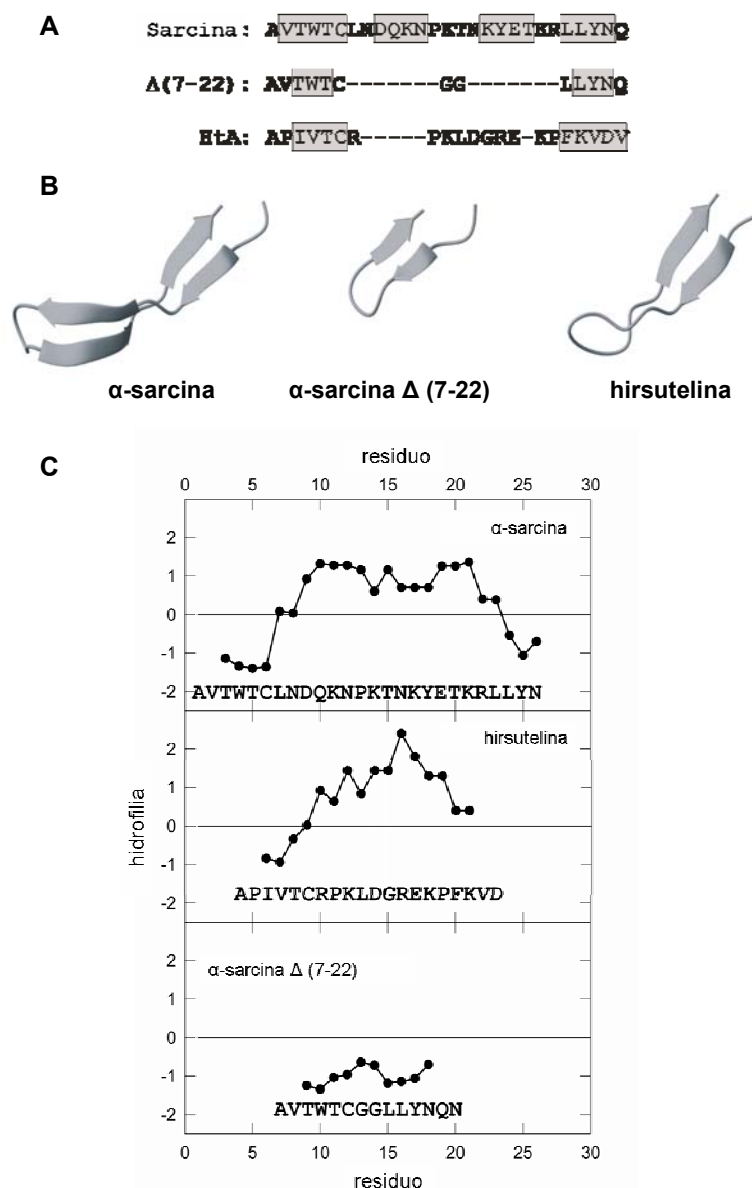


Figura 45. A: Secuencias de las horquillas aminoterminales de α -sarcina, su mutante de delección $\Delta(7-22)$ e hirsutelina. Los residuos que forman parte de hebras β aparecen destacados en gris. **B:** Estructuras tridimensionales de las horquillas aminoterminales de las tres proteínas. Los diagramas fueron generados con el programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996) a partir de las coordenadas depositadas en el PDB en los dos primeros casos (1DE3 para α -sarcina y 1R4Y para el mutante $\Delta(7-22)$). Las coordenadas atómicas de la hirsutelina fueron generadas con el programa FUGUE (Shi *et al.*, 2001). Las tres estructuras fueron ajustadas a las coordenadas de los enlaces peptídicos entre los residuos 5 y 6 de las tres proteínas. **C:** Perfiles de hidrofilia (Chou y Fasman, 1978) de los fragmentos aminoterminales de las tres proteínas comparadas.

Por lo que respecta al resto de la estructura general de las ribotoxinas, las cuatro cisteínas que se encuentran en la secuencia de la HtA darían cuenta de la formación de los dos puentes disulfuro característicos de esta familia, que en este caso unirían las posiciones 6-129 y 57-108. Los estudios de estabilidad térmica prueban, por otra parte, que la estructura de la HtA es más estable que la de la α -sarcina (*Figura 20 y Tabla II*). La estabilidad de esta ribotoxina es menor que la de otros miembros bien caracterizados de la misma familia, como la restrictocina, en parte a causa de los ángulos torsionales inusuales del Glu 140, los cuales mantienen la conformación única del bucle 5 (Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000). Estos ángulos están favorecidos en la α -sarcina por un enlace de hidrógeno entre el Glu 140 y la Lys 11, como demuestra el hecho de que el mutante K11L de esta proteína ve incrementada su estabilidad térmica (García-Ortega *et al.*, 2001). El menor tamaño de la horquilla aminoterminal de la HtA impide la formación de este enlace, lo que favorece una mayor T_m (62°C frente a 59°C de restrictocina y 52°C de α -sarcina).

proteína	T_m por CD (°C)	ΔH_m por CD (Kcal/mol)	T_m por DSC (°C)	ΔH_m por DSC (Kcal/mol)
HtA	62	93	61.8	85
α -sarcina	52	142	52.6	136

Tabla II. Parámetros termodinámicos de la desnaturalización térmica de HtA y α -sarcina para medidas a pH 7.0 a una velocidad de barrido de 30°C/h.

Todas las consideraciones hasta aquí expuestas están fundamentadas en predicciones basadas en el análisis comparativo de la secuencia de la HtA con las secuencias y estructuras de las ribotoxinas y RNasas inespecíficas conocidas. La reciente obtención de la estructura tridimensional en disolución de la HtA, gracias a los estudios de RMN realizados gracias a la colaboración con el grupo de la Dra. Marta Bruix, permite un análisis más detallado. La *Figura 46* muestra el alineamiento de la secuencia de la HtA con los principales miembros de la superfamilia de la barnasa, diferenciando por colores los distintos elementos de estructura secundaria. Como se puede comprobar, el alineamiento de partida coincide casi a la perfección con la realidad a la vista de la estructura obtenida. Esta estructura aparece comparada con las de la RNasa T1 y la α -sarcina en la *Figura 47*. Se confirma que el núcleo central de estructura β de las dos familias representadas por estas proteínas aparece mayoritariamente conservado en la HtA. En esta, la hélice α es algo más corta que en la T1, estando más próxima en tamaño a las tres vueltas de hélice de las ribotoxinas.

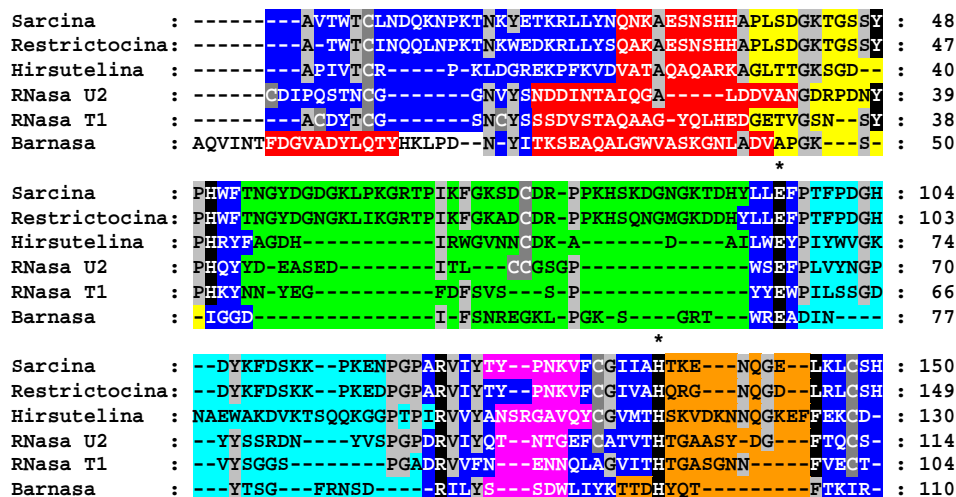


Figura 46: A: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la hirsuteline con los principales miembros de la superfamilia de la barnasa. En negro, los residuos con implicación conocida en el centro activo (con asterisco, los residuos esenciales para la funcionalidad del mismo); en gris oscuro, las cisteínas implicadas en la formación de puentes disulfuro; en gris claro, residuos conservados en al menos cuatro de las cinco secuencias. Los colores delimitan fragmentos de estructura secundaria (azul, lámina β ; rojo, hélice α ; amarillo, verde, celeste, magenta y naranja, bucles 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente). El código de colores coincide con el empleado en la *Figura 2* y las representaciones de estructuras. (-) indica ausencia de aminoácido.

En lo que se refiere a los bucles de estructura aperiódica, la HtA muestra algunas diferencias importantes tanto con la RNasa T1 como con la α -sarcina. El bucle 1 está formado, al igual que en la RNasa T1, por diez aminoácidos, tres menos que en la α -sarcina. Especialmente llamativa resulta la reducción de tamaño que con respecto al resto de las ribotoxinas presenta la HtA en el bucle 2 (18 aminoácidos frente a 41 en α -sarcina). Sin embargo, la estructura de este bucle en la HtA reproduce casi exactamente la de su fragmento homólogo en la α -sarcina, siendo especialmente significativa la conservación de tres aminoácidos en hélice 3_{10} : Asn 56, Cys 57 y Asp 58 (Asp 75, Cys 76 y Asp 77 en α -sarcina). Curiosamente, la parte de este bucle en que difieren α -sarcina y HtA está delimitada por la región que en la primera se estabiliza por una interacción entre Asn 54 e Ile 69, muy conservada en las RNasas extracelulares fúngicas (Mancheño *et al.*, 1995b; Sevcik *et al.*, 1991; Pfeiffer *et al.*, 1997; Hebert *et al.*, 1998) y posiblemente implicada en formar el bolsillo de reconocimiento de sustrato (Yang y Moffat, 1996). En la HtA, la posición equivalente a la Asn 54 está ocupada por el Asp 48. Este residuo está muy próximo en el esqueleto covalente a la Ile 50, correspondiente a la Ile 69 de α -sarcina (*Figura 48*). Por tanto, la interacción 54-69 parece aproximar dos residuos de las ribotoxinas que de por sí ya lo están en la HtA y mantener así una conformación determinada en la parte del bucle que es común a todas ellas.

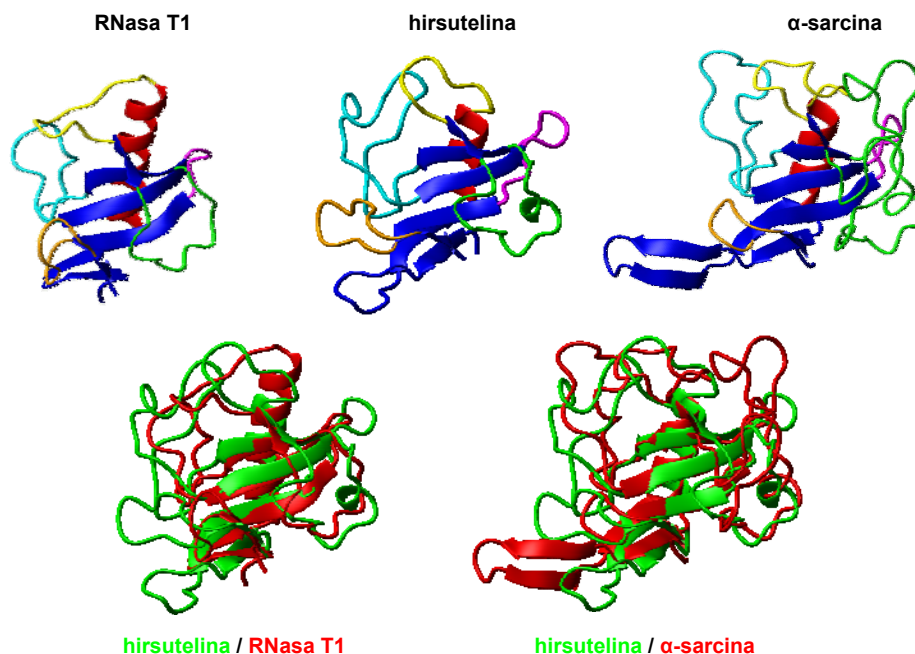


Figura 47: Superposición de la estructura de la hirsutelina con las de la RNasa T1 y la α-sarcina. Se mantiene en la parte superior el código de colores empleado en el resto de las figuras para los distintos fragmentos de estructura secundaria. En las superposiciones se representa en verde la estructura de la hirsutelina y en rojo las de la RNasa T1 (izquierda) y α-sarcina (derecha). Diagramas generados con el programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).

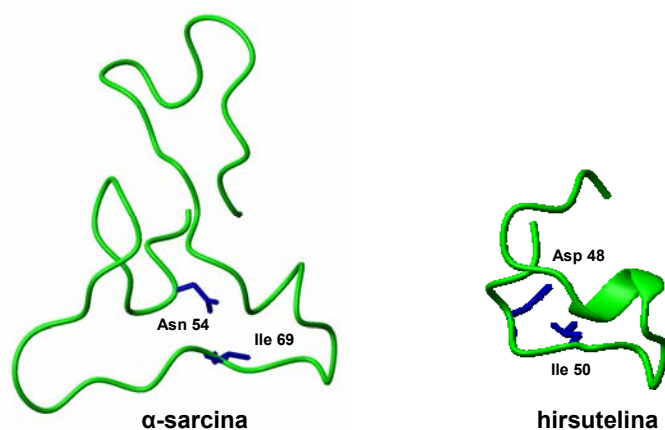


Figura 48. Comparación de las estructuras tridimensionales de los bucles 2 de α-sarcina y HtA. Se destacan las posiciones de los residuos Asn 54 e Ile 69 de la α-sarcina y de sus equivalentes en la HtA (Asp 48 e Ile 50).

Pero si el bucle 2 es mucho menor en la HtA que en la α -sarcina, lo contrario ocurre con los bucles 3 y 5. El primero está formado por 26 aminoácidos, frente a 21 en la α -sarcina y 15 en la RNasa T1, mientras que el segundo comprende cinco aminoácidos más en la HtA que en las otras ribotoxinas. También es destacable el mayor tamaño del bucle 4 de la HtA (9 aminoácidos, frente a 6 en α -sarcina y 3 en la RNasa T1).

Por último, hay que prestar especial atención a la horquilla aminoterminal, cuya implicación en la funcionalidad de las ribotoxinas ha quedado bien demostrada (García-Ortega *et al.*, 2001, 2002, 2005a; García-Ortega, 2004). Los estudios de RMN confirman que en la HtA este elemento de la estructura presenta un tamaño intermedio entre los de sus equivalentes en α -sarcina y RNasa T1 (20 aminoácidos en HtA, 26 en α -sarcina y 12 en RNasa T1). Precisamente, las inserciones que la HtA muestra en el bucle 5 hacen que este adopte una conformación espacial cercana a la de la parte de la horquilla de la que carece esta proteína. Estas inserciones incluyen además dos lisinas (118 y 123) y una asparagina que compensan la ausencia en el extremo aminoterminal de la HtA de algunos residuos de la misma naturaleza básica que sí están presentes en el de la α -sarcina (Figura 46). Estos residuos podrían tener importantes implicaciones funcionales, como se discutirá más adelante. La horquilla aminoterminal de las ribotoxinas ha sido destacada además como uno de los elementos clave en el carácter alergénico de estas proteínas, habiéndose comprobado que uno de los principales antígenos de Asp f 1, si bien no el único, se localizaba en este elemento de su estructura (García-Ortega *et al.*, 2005a). Los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición por parte de la HtA de la señal de Asp f 1 frente a las IgE contenidas en sueros de pacientes alérgicos parecen confirmar este punto (Figura 21). El desplazamiento máximo obtenido con la HtA en estos experimentos igualó el conseguido con el mutante de delección Asp f 1 Δ (7-22), si bien la HtA parece presentar una mayor afinidad por los anticuerpos ensayados que la variante truncada del alérgeno de *Aspergillus fumigatus* (menor concentración necesaria para lograr el 50% de inhibición). Esto está de acuerdo con que el tamaño de la horquilla de la HtA resulte intermedio entre el de la ribotoxina Asp f 1 completa y su mutante de delección. La HtA carecería de los residuos que conforman el determinante antigénico implicado en la respuesta estudiada, pero conservaría algunos que le dotarían de una afinidad algo mayor por los anticuerpos que la observada para Asp f 1 Δ (7-22). Así, cabe la posibilidad de que mutantes no citotóxicos de HtA pudieran servir por tanto como variantes hipoalergénicas de ribotoxinas para su uso en terapia y diagnóstico de las hipersensibilidades en las que están implicadas estas proteínas.

Características funcionales. La reacción catalizada por las ribotoxinas y las RNasas inespecíficas tiene lugar a través de un mecanismo de transfosforilación que implica un par catalítico constituido por un ácido y una base a cada lado del enlace a hidrolizar (Steyaert, 1997; Lacadena *et al.*, 1998). En la α -sarcina, el Glu 96 y la His 137 actúan como base y ácido, respectivamente (Lacadena *et al.*, 1998), mientras que en la RNasa T1 son el Glu 58 y la His 92 quienes desempeñan esa función (Steyaert, 1997) (*Figura 3*). En la HtA, es fácil reconocer estos residuos en el Glu 66 y la His 113 de acuerdo con el alineamiento de secuencia de la *Figura 12* (Herrero-Galán *et al.*, 2008b). También se ha demostrado la implicación en la catálisis de la His 50 de la α -sarcina y dicho residuo encontraría su homólogo en la His 42 de la HtA (Herrero-Galán *et al.*, 2008b). En la RNasa T1, los residuos Tyr 38, Arg 77 y Phe 100 están también involucrados en la catálisis, habiéndose propuesto que forman un microentorno estructural y dieléctrico complementario a los oxígenos ecuatoriales del estado de transición (Loverix y Steyaert, 2001). La participación en el mecanismo catalítico de los aminoácidos correspondientes en la estructura de la α -sarcina (Tyr 48, Arg 121 y Leu 145) ha sido igualmente demostrada (Masip *et al.*, 2001, 2003; Álvarez-García *et al.*, 2006). Las estructuras cristalinas de distintos complejos de restrictocina con inhibidores condujeron a la propuesta de que estos residuos podrían facilitar la reorientación de base que mediante la distorsión del enlace a hidrolizar necesita llevar a cabo la tríada catalítica para permitir el corte de un único enlace fosfodiéster (Yang *et al.*, 2001; Álvarez-García *et al.*, 2006). Dos de estos aminoácidos pueden ser relacionados con la Arg 95 y la Phe 126 de la HtA, de nuevo basándose en el alineamiento de secuencia propuesto (*Figura 12*) (Herrero-Galán *et al.*, 2008b). La Phe 100 de la RNasa T1 aparecía sustituida por Leu en las ribotoxinas hasta ahora conocidas, pero en la HtA vuelve a aparecer en esa posición una fenilalanina (Phe 126).

Una vez más, las predicciones respecto al centro activo de la HtA basadas en alineamientos de secuencia pueden ser en su mayoría confirmadas a la luz de la estructura tridimensional de la proteína. La *Figura 49* muestra los residuos propuestos para el centro activo de la HtA en comparación con los de la α -sarcina y la RNasa T1. Como se puede observar, todos los residuos que se han postulado más arriba como potencialmente involucrados en el centro activo de la HtA ocupan posiciones en su mayoría equivalentes a sus homólogos en las otras dos proteínas. Sin embargo, según esta estructura, la Tyr 44 de HtA no puede dar cuenta del papel desempeñado en la α -sarcina por la Tyr 48, como se había llegado a proponer a la vista del alineamiento de secuencia (Herrero-Galán *et al.*, 2008b). Más cercana a la posición equivalente a la Tyr 48 de α -sarcina está en la HtA la Tyr 67, pero ésta se encuentra orientada de tal manera que su cadena lateral queda al lado opuesto de la hebra β . Sin embargo, el Asp 40 de la HtA sí

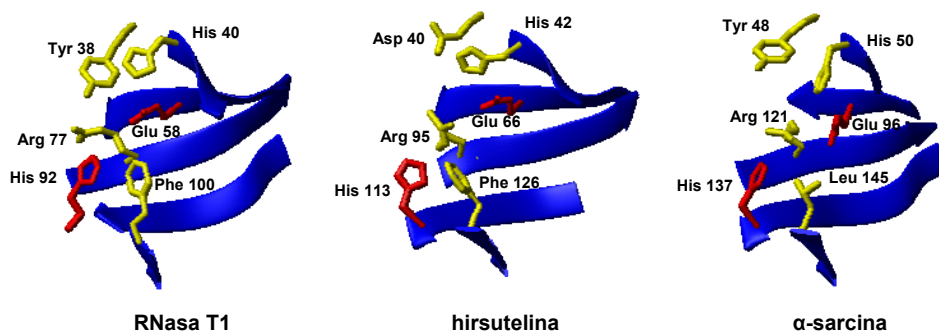


Figura 49. Comparación de los centros activos de la RNasa T1 y la α -sarcina con los aminoácidos correspondientes de la hirsutelina. Se destacan en rojo los residuos que se ha demostrado que son esenciales para la funcionalidad de la RNasa T1 y la α -sarcina; en amarillo, otros residuos con implicación conocida en el centro activo. Se aplica el mismo código de colores para los aminoácidos equivalentes de la estructura de la HtA. Los diagramas fueron generados con MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996)

presenta una disposición espacial que le permitiría participar en la catálisis (Figura 49). Apoya parcialmente esta idea el hecho de que este residuo se encuentra además formando un puente salino con la His 42.

Los diferentes ensayos de actividad realizados con la HtA sobre distintos sustratos han permitido demostrar que reproduce el comportamiento propio de las ribotoxinas. En primer lugar, la HtA exhibe actividad ribonucleolítica sobre homopolinucleótidos como el poli(C) (Figura 22). Aunque esto supone una diferencia respecto a la α -sarcina, que no actúa sobre este homopolinucleótido pero sí sobre poli(A), se ha observado ya previamente cómo distintas ribotoxinas y sus mutantes pueden exhibir diferentes especificidades frente a sustratos homopoliméricos a pesar de mantener la misma especificidad de corte sobre los ribosomas (Fando *et al.*, 1985). Se ha propuesto que la eficacia enzimática de la α -sarcina depende de interacciones entre la His 137 catalítica, el bucle 5 y la horquilla aminoterminal, por comparación con la RNasa T1 (Pace *et al.*, 1991; Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000). Las propiedades catalíticas de las ribotoxinas frente a sustratos no específicos parecen depender de interacciones de aminoácidos de la mencionada horquilla que afectan el entorno y/o a la accesibilidad de la His 137 (García-Ortega *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la introducción de mutaciones puntuales o deleciones en la región aminoterminal da lugar a variantes de ribotoxinas con actividad ribonucleolítica no específica modificada (Lamy *et al.*, 1992). Teniendo en cuenta todo esto, parece factible que las variaciones en tamaño que con respecto a otras ribotoxinas presenta la HtA tanto en la horquilla aminoterminal como en el bucle 5 puedan ser responsables del efecto obtenido sobre sustratos no específicos.

En segundo lugar, los resultados del presente trabajo han demostrado la actividad ribonucleolítica específica de la HtA tanto sobre ribosomas eucariotas

como sobre el lazo SRL (*Figuras 23 y 24*). Estos sustratos han servido además para comprobar la implicación en la actividad de los residuos propuestos para el centro activo de la proteína, gracias a los experimentos llevados a cabo con mutantes en los que se sustituía uno o varios de estos residuos por glutamina (H42Q, E66Q, H113Q y mutantes dobles y triple en todas las combinaciones posibles). Después de haberse comprobado que ninguna de estas mutaciones altera significativamente la estructura global de la proteína, los ensayos de actividad permiten asegurar que todos los aminoácidos modificados participan de un modo u otro en el mecanismo catalítico. El mutante triple y los mutantes dobles carecen por completo de actividad frente a ribosomas o el oligonucleótido SRL (*Figuras 39 y 40*). Los mutantes individuales retienen algo de actividad frente a los ribosomas del lisado de reticulocitos de conejo, pero resultan totalmente inactivos frente al SRL. Estos resultados están de acuerdo con la existencia de regiones de interacción con el ribosoma adicionales al SRL, de las cuales depende en gran medida la especificidad extremadamente alta de las ribotoxinas, así como con el planteamiento de que la actividad de la proteína requiere de un microentorno dieléctrico muy definido para tener lugar. Las mutaciones puntuales introducidas estarían modificando el centro activo, así como ese microentorno tan crítico, de manera que la proteína sería incapaz de acoplar adecuadamente el SRL aislado para su degradación. Sin embargo, cuando esas modificaciones se reducen a mutaciones individuales, el contexto del ribosoma y las interacciones establecidas con este serían suficientes para posibilitar el encuentro del sustrato con el centro activo de la ribotoxina. Así se explicaría que los mutantes H42Q, E66Q y H113Q retengan actividad frente a ribosomas completos a pesar de no actuar sobre el oligonucleótido SRL (*Figuras 39 y 40*). Especial mención merece el caso del mutante del Glu 66 de HtA, que parece ser igual de activo frente a los ribosomas que la proteína con la secuencia original. Este hecho podría estar de acuerdo con la implicación del Asp 40 en el centro activo desempeñando el papel del Glu 66 en ausencia de este, como se ha comentado más arriba. Sin embargo, esta hipótesis deberá ser confirmada mediante el diseño y estudio de nuevos mutantes dirigidos a comprobar la participación de este residuo en la actividad de la proteína. En cuanto al mutante triple de triptófanos W65/71/78F, que exhibe idéntico comportamiento al de los mutantes individuales, el hecho de que sea capaz de mantener intacta su actividad frente a ribosomas sin degradar el SRL aislado informa de la importancia de esos tres residuos, dos de ellos pertenecientes al bucle 3, en el reconocimiento del lazo sarcina/ricina. Se ha demostrado que la especificidad de la actividad ribonucleolítica de las ribotoxinas depende en gran medida de interacciones con el SRL (Yang y Moffat, 1996; Correll *et al.*, 1998; Pérez-Cañadillas *et al.*, 2000) y la implicación del bucle 3 en tal reconocimiento ha sido probada por medio de mutantes de delección en esa región, que perdían la capacidad para reconocer y degradar el SRL (Kao y Davies, 1995). La

eliminación de estos tres triptófanos, de los cuales dos situados en el bucle 3 de la HtA, estaría impidiendo por tanto una interacción necesaria para el reconocimiento del SRL aislado, reconocimiento que en el contexto del ribosoma se vería una vez más favorecido por la existencia de interacciones adicionales. Esta explicación encuentra apoyo en la reciente demostración de que el contexto ribosomal incrementa en varios órdenes de magnitud la reacción de degradación del SRL por parte de la α -sarcina (Korennykh *et al.*, 2006).

Entre el conjunto de esas otras interacciones con el ribosoma, resultan especialmente destacables las establecidas por el bucle 2 y la horquilla aminoterminal de las ribotoxinas con proteínas ribosomales. Ya se ha mencionado en la introducción cómo el primero establecería contacto con la proteína L6, mientras que la segunda interaccionaría con la proteína L14, según un modelo de reconocimiento del ribosoma utilizando las estructuras tridimensionales de la α -sarcina y su mutante de delección Δ (7-22) (Figura 7) (García-Mayoral *et al.*, 2005b). Esta variante truncada mantiene su actividad ribonucleolítica frente a dinucleósidos fosfato, así como la capacidad para degradar específicamente el oligonucleótido SRL sintético, pero no puede actuar sobre ribosomas intactos (García-Ortega *et al.*, 2002, 2005a). Entre los residuos presumiblemente implicados en la interacción de la horquilla aminoterminal de la α -sarcina con L14, la atención se ha centrado principalmente en las lisinas 11, 14, 17 y 21. Como ya se ha comentado previamente, algunas de las principales diferencias entre el extremo N terminal de la HtA y el de la α -sarcina se refieren precisamente a la ausencia en el primero de residuos de lisina, glutamina y asparagina que sí están presentes en el segundo. También se ha resaltado a la hora de hacer consideraciones estructurales el hecho de que algunas de esas carencias podrían suplirse en la HtA con las inserciones que presenta el bucle 5 de esta proteína respecto al resto de ribotoxinas. La Figura 50 muestra las lisinas que HtA y α -sarcina exponen en la horquilla aminoterminal y el bucle 5 de cada

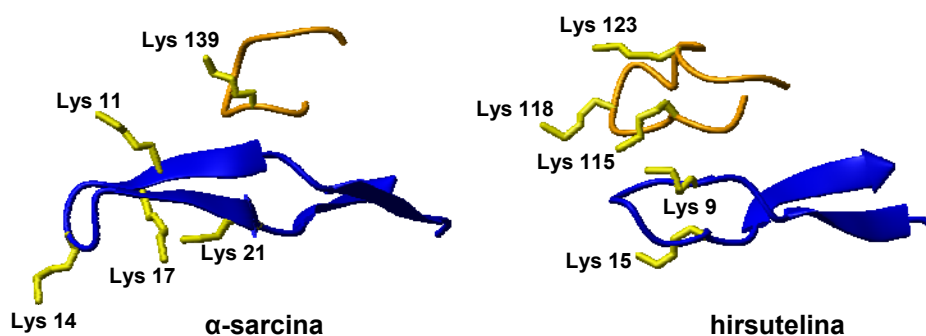


Figura 50. Disposición espacial de las cadenas laterales de los residuos de lisina presentes en el bucle 5 y la horquilla aminoterminal de α -sarcina y HtA. Diagramas generados con el programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).

una de ellas. Como se puede observar, la α -sarcina dispone cuatro residuos de este tipo con las cadenas laterales orientadas hacia el disolvente en su horquilla aminoterminal, mientras que la HtA sólo presenta dos en esta zona (Lys 9 y Lys 15). Sin embargo, la proteína de *Hirsutella thompsonii* posee un bucle 5 mucho más largo y protuberante que el de la α -sarcina, en el que además se localizan hasta tres lisinas (115, 118 y 123) con la disposición espacial adecuada para cumplir la potencial función de las lisinas 11, 14, 17 y 21 de α -sarcina en cuanto a su interacción con el ribosoma. En total, la HtA suma cinco residuos de este tipo con la orientación apropiada entre su horquilla aminoterminal y su bucle 5, los mismos que se encuentran en las regiones equivalentes de la α -sarcina. La posible importancia de estos residuos en la interacción con vesículas lipídicas se discutirá más adelante.

Antes es necesario hacer referencia a la actividad de la HtA sobre dinucleósidos monofosfato, para completar así el conjunto de sustratos frente a los que se ha ensayado esta proteína. De los resultados de estos estudios se desprenden unos valores de K_M , K_{cat} y eficacia catalítica muy similares a los de la α -sarcina (Figura 25 y Tabla III). El hecho aparentemente contradictorio de que la HtA degrade ApA y no poli(A) se explica por el carácter polimérico de este último sustrato, las diferentes condiciones del ensayo y el medio en el que se realiza el mismo (el ApA está en disolución, mientras que el poli(A) se encuentra embebido en un gel). Quizás lo más interesante de estos experimentos sea el perfil de actividad frente al pH obtenido para la HtA. Esta proteína actúa de forma óptima a pH entre 7 y 8, mientras que la α -sarcina lo hace a pH 5'0. Precisamente a ese pH se observa un hombro en la curva de actividad de la HtA, lo que podría dar cuenta de un doble mecanismo en esta proteína similar al que se ha propuesto para la α -sarcina (Lacadena *et al.*, 1998). Por lo demás, es digno de reseñar que el perfil de actividad frente al pH de la HtA resulta más parecido al de la RNasa T1, mientras que el de la α -sarcina es más similar al de la U2, que también actúa preferentemente a pH ácido.

proteína	ApA			CpC		
	K_M (μM)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_M ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	K_M (μM)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_M ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
HtA	32'7	$1'03 \times 10^{-4}$	3'15	716	$5'5 \times 10^{-4}$	0'76
α -sarcina	40'0	$1'0 \times 10^{-4}$	2'5	422	$5'1 \times 10^{-5}$	0'12

Tabla III. Parámetros cinéticos de las actividades de HtA y α -sarcina frente a ApA y CpC. Valores determinados a partir del análisis de dobles inversas tras ajuste al modelo de Michaelis-Menten.

Interacción con membranas y citotoxicidad. Si ya se ha discutido acerca de la actividad ribonucleolítica específica de las ribotoxinas y de las interacciones que se deben dar entre estas y el ribosoma para ejercer su acción, es obligatorio hacerlo ahora de la interacción con membranas, pues esta constituye la primera etapa necesaria, además de la limitante, para desencadenar en último término la respuesta citotóxica.

La interacción de las ribotoxinas con las células diana depende de interacciones moleculares directas entre la proteína y elementos de la membrana, ya que no se ha encontrado receptor celular alguno. Posteriormente, la ribotoxina es internada por endocitosis a través de endosomas ácidos y paso por el aparato de Golgi (Olmo *et al.*, 2001; Lacadena *et al.*, 2007; Carreras-Sangrá *et al.*, 2008; Herrero-Galán *et al.*, 2008a). Este paso ha sido bien estudiado en el caso de la α -sarcina y se considera que ocurre inicialmente a través de interacciones con los fosfolípidos ácidos de las membranas. Este hecho está de acuerdo con la acción preferente de las ribotoxinas sobre células transformadas o infectadas por virus, en las que la pérdida de simetría de la membrana plasmática induce una mayor exposición de PS y otros fosfolípidos ácidos al medio extracelular (Bergelson *et al.*, 1970; Turnay *et al.*, 1993; Orntoft y Vestergaard, 1999; Ran *et al.*, 2002). Esta hipótesis ha sido apoyada recientemente por el descubrimiento de la implicación de las enzimas responsables de la síntesis del ácido fosfatídico (diacilglicerol quinasas) en la transformación maligna (Filigheddu *et al.*, 2007; Griner y Kazanietz, 2007; Mérida *et al.*, 2008). Estudios con vesículas fosfolipídicas modelo han demostrado que la α -sarcina provoca en ellas alteraciones conducentes a agregación, mezcla de lípidos y pérdida de contenidos acuosos (Gasset *et al.*, 1989, 1990, 1991a; Mancheño *et al.*, 1994a). Los resultados obtenidos en esta Tesis prueban que la HtA también promueve cambios en estas vesículas (*Figuras 26 a 31*), si bien su interacción con ellas parece ser de grado y/o naturaleza distinta a la de la α -sarcina. Así, la HtA no es capaz de producir agregación de vesículas de fosfolípidos ácidos, a pesar de inducir permeabilización de las mismas (*Figuras 26 y 27*). Los cambios producidos por la HtA en el termograma de este lípido también difieren de los efectos de la α -sarcina (*Figura 30*), y sin embargo demuestran la existencia de interacción entre la HtA y fosfolípidos ácidos sin que estos introduzcan grandes cambios en la estructura de la proteína (*Figuras 28 y 29*). Los experimentos de calorimetría de titulación isotérmica certifican la existencia de cierta interacción entre ambas especies, si bien esta unión parece estar gobernada por una constante tan baja que la titulación de la misma podría quedar por debajo de los límites de detección de esta técnica (*Figura 31*).

Ya se ha hablado antes de los bucles de estructura secundaria no repetitiva que las ribotoxinas presentan de modo adicional a la estructura general de las RNAsas no tóxicas de la familia T1, y de cómo estos se postulan como regiones presumiblemente implicadas en la interacción con membranas. En

general, las proteínas que interaccionan con vesículas pueden causar agregación o mezcla de lípidos acompañados o no de pérdida de contenidos acuosos, o bien inducir permeabilización sin agregación. En este sentido, la HtA y la α -sarcina se comportan de un modo diferente, ya que la primera no es capaz de provocar la formación de agregados vesiculares que sí logra la segunda y sin embargo ambas inducen liberación de los contenidos internos de las vesículas sobre las que actúan (Figuras 26 y 27). Se ha propuesto que la α -sarcina podría actuar como puente para dimerizar vesículas en las primeras etapas de la agregación (Mancheño *et al.*, 1994a) y dos regiones de la proteína han sido destacadas como las supuestamente implicadas en ese proceso: la horquilla aminoterminal y el bucle 2. Estas dos regiones presentan abundancia de residuos cargados positivamente y son precisamente aquellas en las que se detectan mayores diferencias con la HtA (Figuras 46 y 47). Ya se han comparado en esta discusión los extremos aminoterminales de ambas proteínas y la presencia en ellos de residuos básicos, viéndose cómo las inserciones del bucle 5 de HtA podrían compensar las carencias de aminoácidos de esta naturaleza en su horquilla aminoterminal (Figura 50). Sin embargo, también se ha comentado al comparar las estructuras de las dos toxinas que el bucle 2 de la HtA está reducido a más de la mitad respecto al de la α -sarcina, y precisamente en esa región de la que carece la proteína de *Hirsutella thompsonii* se localizan muchos de los aminoácidos básicos presumiblemente implicados en la interacción con

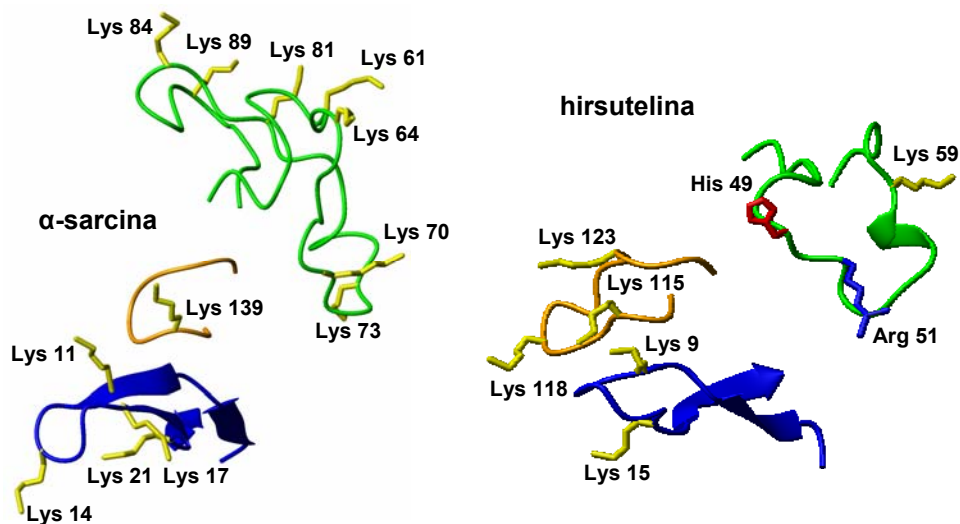


Figura 51. Horquilla aminoterminal y bucles 2 y 5 de α -sarcina e hirsutelina. Se destacan en el caso de la α -sarcina los residuos de lisina (amarillo) en las tres regiones. Para la hirsutelina se muestran además otros aminoácidos básicos del bucle 2 (histidina, en rojo y arginina, en azul). El código de colores para los elementos de estructura secundaria coincide con el empleado a lo largo de toda la Memoria (extremo aminoterminal, en azul; bucle 2, en verde; bucle 5, en naranja). Los diagramas fueron generados con MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).

lípidos de la α -sarcina. En la *Figura 51* se compara la orientación de los residuos de lisina en la horquilla aminoterminal y el bucle 2 de la α -sarcina con la de la HtA en las mismas regiones. Como se puede observar, la α -sarcina dispone de al menos cinco residuos de lisina con el grado de exposición adecuado para interactuar con vesículas ácidas en el extremo opuesto de su horquilla N terminal. La HtA, por su parte, apenas dispone de un residuo que se pudiera considerar capaz de emular esa acción. Ni siquiera considerando además de las lisinas el resto de aminoácidos básicos del bucle 2 de la HtA se logra un entorno de carga positiva comparable en cuanto a su susceptibilidad para interactuar con fosfolípidos ácidos. Se podría decir, por tanto, que la HtA carece de una de las dos regiones necesarias para actuar de puente entre vesículas en las primeras etapas de la agregación, lo que impide que esta se desencadene del modo en que lo hace en presencia de α -sarcina, proteína que sí dispone de dos dominios con las características necesarias para inducir la dimerización de vesículas, actuando como puente entre ellas.

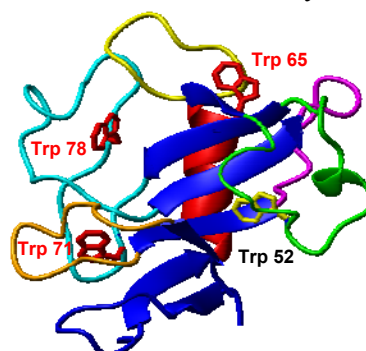
Pero más allá del modo en que α -sarcina y HtA interaccionen con vesículas fosfolipídicas, lo cierto es que ambas proteínas son igualmente capaces de establecer contacto con la célula diana e internarse en su citoplasma para ejercer la acción citotóxica propia de las ribotoxinas. Así lo demuestra el idéntico comportamiento de ambas proteínas en los ensayos de citotoxicidad sobre células de rhabdomiosarcoma humano (*Figura 32*). Tanto la α -sarcina como la HtA producen inhibición de la biosíntesis de proteínas en estas células transformadas con valores de IC_{50} indistinguibles (en torno a $1\mu M$ en ambos casos). Se ha mencionado en varias ocasiones que la preferencia por células tumorales o infectadas por virus exhibida por las ribotoxinas al ejercer su acción citotóxica podría deberse a la mayor abundancia de fosfolípidos ácidos que generalmente presenta la cara externa de la membrana de los tipos celulares mencionados (Bergelson *et al.*, 1970; Turnay *et al.*, 1993; Orntoft y Vestergaard, 1999; Ran *et al.*, 2002). De modo general, la basicidad de la proteína parece ser uno de los factores clave en la citotoxicidad, como ya se ha visto para otras RNAsas (Di Donato *et al.*, 1994; Vatzaki *et al.*, 1999; Ilinskaya *et al.*, 2002). Recientemente, se ha demostrado que proteínas policationicas, particularmente aquellas con un sitio de anclaje hidrofóbico, se asocian con regiones de la membrana y compartimentos subcelulares ricos en fosfatidilserina, como endosomas o lisosomas (Yeung *et al.*, 2008). Este fosfolípido regularía tanto la carga superficial de la célula como la localización de este tipo de proteínas (Yeung *et al.*, 2008). Así se ha demostrado que sucede con el dominio C2 de la lactadherina (C2-Lact), proteína de la leche materna presumiblemente implicada en la transferencia de inmunidad al neonato por parte de la madre (Yeung *et al.*, 2008). Esta proteína presenta en el dominio C2 mencionado gran abundancia de aminoácidos básicos que la hacen susceptible de localizarse según la manera descrita y dirigirse preferentemente a células transformadas.

Curiosamente, si se alinea la secuencia del dominio C2 de la lactadherina con la de las ribotoxinas comparadas en esta Tesis, se obtienen grados de homología nada despreciables (*Figura 52*). Esta homología es especialmente relevante en el caso de la α -sarcina, pues se refleja además en su estructura tridimensional (*Figura 52 A y B*). Si se analiza pormenorizadamente el alineamiento de las secuencias de la α -sarcina y el dominio C2 de la lactadherina, una de las zonas que concentra mayores semejanzas es la comprendida entre los residuos 100 y 127 de la ribotoxina (115-142 en C2-Lact). Esta región está delimitada por prolinas, residuos que se encuentran en gran número en el fragmento mencionado y que aparecen conservados en la mayoría de los casos en el dominio C2. Si se acude a la estructura tridimensional de ambas proteínas en la zona especificada se encuentra un elevado parecido conformacional. Se da la circunstancia, además, de que esa región de la estructura de la α -sarcina incluye el fragmento 116-139, implicado en el paso de la proteína al interior de las vesículas gracias a una interacción hidrófoba (Oñaderra *et al.*, 1993; Gasset *et al.*, 1994, 1995a), como se puso de manifiesto con un péptido sintético constituido por esa secuencia (Mancheño *et al.*, 1995a). También ese fragmento de menor tamaño presenta una conformación parecida a la de la región correspondiente de C2-Lact (*Figura 52 B*). La comparación se puede reducir incluso a la región 131-139 de la α -sarcina y su equivalente en C2-Lact sin perder sustentación. Hay que recordar que un péptido que comprendía únicamente la secuencia 131-139 de α -sarcina era capaz de mimetizar los efectos de la proteína completa en cuanto a su interacción con lípidos (Mancheño *et al.*, 1998b). Estas observaciones conducen a la opción nada desdeñable de plantear el uso del dominio C2 de la lactadherina u otros dominios homólogos para su conjugación con toxinas, a las que conferirían las propiedades de interacción con membranas celulares y su posible internación, persiguiendo los mismos fines que hasta ahora se ha venido buscando lograr mediante el diseño de inmunotoxinas.

Volviendo a los ensayos de citotoxicidad sobre células de rhabdomiosarcoma, estos han desprendido resultados interesantes cuando se han llevado a cabo con los diferentes mutantes purificados y caracterizados en esta Tesis (*Figuras 41 y 42*). Los mutantes individuales de residuos supuestamente implicados en el centro activo se comportaron frente a estas células de modo concordante con los resultados de actividad frente a ribosomas aislados. Así, todos ellos retienen cierta actividad citotóxica a concentraciones en torno al IC_{50} determinado para la proteína sin mutar (*Figura 41*). Se confirma además que el mutante E66Q es el que resulta más activo, mientras que H113Q es el que presenta un comportamiento más lejano al de la HtA intacta. Los resultados con los mutantes dobles y el mutante triple H42/E66/H113Q también están de acuerdo con los resultados obtenidos sobre ribosomas aislados en cuanto a su falta de actividad, aunque la variante E66/H113Q parece conservar una ligera

citotoxicidad. No parece probable que ninguna de las mutaciones hasta ahora mencionadas afecte a la capacidad de interacción con membranas de la proteína, por lo que los resultados con células y ribosomas de lisado de reticulocitos pueden ser directamente comparados. No obstante, es necesario aún confirmar este punto mediante ensayos con sistemas fosfolipídicos modelo. Especialmente interesante es el resultado obtenido con el mutante triple de los triptófanos 65, 71 y 78, todos ellos sustituidos por Phe. La ausencia de estos tres aminoácidos aromáticos de la HtA elimina por completo la citotoxicidad de la proteína (*Figura 42*). Debe tenerse en consideración que esta triple mutación no afecta a la actividad de la proteína sobre ribosomas extraídos del lisado de reticulocitos de conejo, pero sí resulta crítica a la hora de interaccionar con el SRL aislado y degradarlo. El diseño de este mutante se basó en análisis del alineamiento de secuencia de la HtA con la α -sarcina, pues se carecía por aquel entonces de la estructura tridimensional de la que se dispone hoy. A la vista de la posición que ocupan los tres triptófanos mutados en la estructura de la HtA (*Figura 53*) conviene plantear la obtención de mutantes individuales y dobles, pues el Trp 65 parece estar demasiado alejado en la estructura de los otros dos residuos sustituidos. Es muy factible que la pérdida de actividad observada sobre el SRL y la ausencia de toxicidad sobre células se deban a la implicación en los efectos correspondientes de residuos diferentes, y no de los tres a la vez. De todos modos, resulta especialmente necesario en este caso estudiar cómo afecta la ausencia de estos tres residuos a la interacción de la proteína con lípidos, pues HtA W65/71/78F resulta ser el primer mutante de una ribotoxina que manteniendo su actividad ribonucleolítica específica sobre ribosomas aislados no presenta comportamiento citotóxico. De confirmarse que la ausencia de efecto sobre células se debe exclusivamente a la incapacidad de la proteína para interaccionar con la membrana, sin perjuicio de su capacidad inhibidora de la síntesis de proteínas, se habría dado un gran paso hacia la consecución de una inmunotoxina sin citotoxicidad inespecífica, conjugando alguno de los anticuerpos específicos de antígenos presentes en células tumorales mencionados en la introducción con este mutante o incluso con uno posiblemente más sencillo con igual comportamiento sobre ribosomas y células.

Figura 53. Posición de los residuos de triptófano en la estructura tridimensional de la HtA. Se muestran en rojo los tres residuos implicados en la mutación W65/71/78F; el triptófano 52 adicional se destaca en amarillo dentro del bucle 2. El código de colores de los elementos de estructura secundaria es el mismo que se viene empleando a lo largo de toda la Memoria. El diagrama fue generado con MOLMOL (Koradi et al., 1996) a partir de las coordenadas amablemente cedidas por la Dra. Marta Bruix, del Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC, Madrid).



Evolución y posible función biológica de las ribotoxinas

El estudio de la evolución de las ribotoxinas ha suscitado gran interés desde que se demostraron sus analogías con otras RNasas extracelulares no citotóxicas. El gran parecido estructural de las ribotoxinas con las RNasas inespecíficas de la familia T1 ha conducido a la sugerencia de que ambas familias pudieran provenir de un ancestro común (Lamy *et al.*, 1992; Kao y Davies, 1995). La RNasa U2 sobresale entre las RNasas extracelulares fúngicas inespecíficas como la más cercana a las ribotoxinas (Sacco *et al.*, 1983; Martínez del Pozo *et al.*, 1988; Martínez-Ruiz *et al.*, 1999a). Posee diez aminoácidos más que el resto de proteínas de la familia T1 (114 frente a 101-106) y presenta un 34% de identidad de secuencia con las ribotoxinas. Sin embargo, ni siquiera la RNasa U2 posee características similares a las ribotoxinas en cuanto a especificidad y citotoxicidad. Parece claro que estos atributos adicionales de las ribotoxinas se consideran ligados a la mayor longitud de sus bucles de estructura aperiódica y de su extremo N terminal. Se ha propuesto que estos elementos habrían podido evolucionar a partir de la estructura general de una proteína de la superfamilia de las RNasas microbianas extracelulares, con lo que las ribotoxinas resultarían ser un producto de ingeniería natural (Lamy *et al.*, 1992; Kao y Davies, 1995). Este planteamiento centró la atención en la búsqueda de posibles intermedios evolutivos que hubieran adquirido sólo algunas de esas regiones añadidas que confieren actividades adicionales a las ribotoxinas. La hirsutelina A de *Hirsutella thompsonii* se postuló tras su descubrimiento como un posible candidato a ser dicho intermedio a causa de la gran homología encontrada con las ribotoxinas en su secuencia, mucho más corta que las de estas (Martínez-Ruiz *et al.*, 1999b, 2000).

Los resultados de la presente Tesis han demostrado que la HtA debe ser considerada como un nuevo miembro de la familia de las ribotoxinas, resultando ser entre ellas la más pequeña descrita hasta la fecha. La caracterización exhaustiva de la proteína, aquí recogida, prueba que las habilidades de las ribotoxinas pueden ser acomodadas en una estructura de menor tamaño, intermedia entre las de RNasas de tipo T1 y las ribotoxinas previamente conocidas. Esto parece descartar que la HtA sea un intermedio en la evolución de las ribotoxinas, pues no tendría sentido pensar que su estructura se hubiera complicado posteriormente sin que esto rindiera ventaja alguna al organismo productor. Por tanto, cabe la doble posibilidad de que la mayor longitud de la horquilla aminoterminal y los bucles de las otras ribotoxinas se deba a que estos posean funciones aún desconocidas, o bien que la HtA sea una ribotoxina más evolucionada que ha conseguido acoplar todas sus funciones en una cadena polipeptídica más corta, suponiendo así un ejemplo de economía celular.

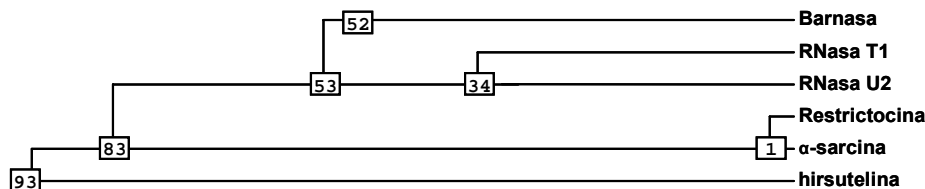


Figura 54. Árbol filogenético de la superfamilia de la barnasa, simplificado para los principales miembros de cada una de las familias. Los números indican las distancias filogenéticas deducidas del alineamiento de las secuencias de las seis proteínas.

Esta segunda hipótesis parece encontrar apoyo cuando se simplifica el árbol filogenético de las proteínas de la superfamilia de la barnasa (*Figura 1*), reduciéndolo a sus principales representantes. La *Figura 54* muestra este árbol, construido a partir de las distancias filogenéticas deducidas del alineamiento de las secuencias de las proteínas que en él aparecen. Como se puede comprobar, la hirsutelina se encuentra a una mayor distancia filogenética de la barnasa que la restrictocina y la α -sarcina. Si se acude a la filogenia de los organismos productores de estas proteínas, también puede encontrarse al género *Hirsutella* por encima de *Aspergillus* en la escala evolutiva (Lutzoni *et al.*, 2001; James *et al.*, 2006). Los hongos del género *Hirsutella* se clasifican dentro de los sordariomicetos, más evolucionados que los eurotiomicetos, entre los cuales se encuentra *Aspergillus*. Sordariomicetos y eurotiomicetos forman parte de los ascomicetos, más evolucionados a su vez que los basidiomicetos, entre los cuales se halla el hongo productor de la RNasa U2, *Ustilago sphaerogena* (Lutzoni *et al.*, 2001; James *et al.*, 2006).

Precisamente este hongo ha sido descrito como un parásito de plantas en el que la producción de RNasas se induce por la presencia de RNA en el medio, lo que apunta hacia la utilización de este como fuente de carbono (Glitz y Dekker, 1964a). Por tanto, las RNasas de la familia T1 podrían cumplir una función de degradación de RNA para su posterior utilización como nutriente, función que también se ha llegado a proponer para las ribotoxinas. Sin embargo, estas resultan mucho menos eficaces que sus homólogas inespecíficas a la hora de degradar RNA en general. Su verdadera ventaja radica en la extraordinaria eficacia con la que son capaces de inactivar ribosomas mediante la hidrólisis de un único enlace fosfodiéster. Existen estudios previos en los que se ha relacionado la expresión de ribotoxinas con la maduración de los conidióforos de los hongos que las producen (Brandhorst y Kenealy, 1992). Recientemente se ha sugerido que las ribotoxinas podrían evitar la destrucción de estos conidióforos por parte de insectos, como escarabajos, con los que el hongo actúa de forma sinérgica al parasitar algunas especies de gramíneas (Brandhorst *et al.*, 1996). Los conidios sólo serían ingeridos una vez maduros, y por tanto resistentes, lo que favorecería su dispersión posterior. También se ha demostrado la acción

entomopatógena de *Aspergillus fumigatus* sobre insectos como *Drosophila* (Lemaitre et al., 1996).

Hirsutella thompsonii fue inicialmente descrito como un hongo entomopatógeno cuya acción insecticida protege a los cítricos en los que habita de plagas de ácaros (Spears y Yothers, 1924; Fisher et al., 1949; Fisher, 1950; Muma et al., 1961; Baker y Neunzig, 1968; McCoy y Selhime, 1977; Samson et al., 1980; Ozman y Goolsby, 2005; Rossi-Zalaf y Alves, 2006). También se ha descrito su acción sobre ácaros que parasitan insectos, como abejas o arañas, sin ser letal para estos, con lo que se plantea como posible agente protector para la abeja de la miel, entre otros (Kanga et al., 2002; Peng et al., 2002; Rosas-Acevedo et al., 2003). La HtA ha sido catalogada como el principal metabolito responsable de la actividad insecticida de *Hirsutella thompsonii* (Liu et al., 1995, 1996; Mazet y Vey, 1995; Omoto y McCoy, 1998; Rosas-Acevedo et al., 2003). Por tanto, su caracterización y su inclusión como nuevo miembro en la familia de las ribotoxinas viene a apoyar la teoría de que estas pudieran estar cumpliendo una función protectora de los hongos que las producen o de las plantas con las que estos pudieran establecer una relación de simbiosis. Siendo esto así, parece razonable pensar que las ribotoxinas pudieran haber evolucionado a partir de una RNasa inespecífica bajo la presión evolutiva de la necesidad de los hongos productores de defenderse del ataque de insectos. En este sentido, cabe plantear la posibilidad de que las ribotoxinas hayan evolucionado hacia la optimización de su correcta interacción con los ribosomas que degradan y no de su actividad catalítica como tal, que resulta muy poco eficaz como RNasa en general si se la compara con otras de actividad inespecífica. Sin embargo, considerando como sustrato el ribosoma completo, las ribotoxinas son mucho más eficaces que las RNasas inespecíficas: la α -sarcina, por ejemplo, presenta una eficacia de inactivación ($k_{cat}/K_M = 1.7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) comparable a la de las enzimas más eficaces conocidas (Korennykh et al., 2006). Las diferencias encontradas a nivel de estructura entre la HtA y otras ribotoxinas podrían también deberse, por tanto, a que hubieran sido optimizadas para degradar ribosomas diferentes o interaccionar con membranas de diferente composición. En lo que se refiere a la primera posibilidad, el ensayo de la actividad de las ribotoxinas frente a ribosomas de diferentes orígenes, en especial procedentes de insectos, podría aportar información muy valiosa por comparación de la eficacia de estas proteínas sobre ribosomas de diferentes especies. Respecto a la segunda opción, resulta interesante destacar que las membranas de células de insecto presentan en muchos casos características comunes a las células transformadas (Rosas-Acevedo, 2003), con lo que la actividad de las ribotoxinas sobre las segundas podría derivarse de su capacidad natural para penetrar en las primeras.

Todas estas disquisiciones pueden ser en parte sustentadas por los resultados de los ensayos de citotoxicidad sobre células de insecto presentados

en esta Tesis (*Figuras 33 a 36*). Según estos experimentos, la α -sarcina es capaz de emular la acción insecticida de la HtA sobre células de los insectos *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*, sin grandes diferencias entre ambas proteínas. No obstante, estos experimentos deben ampliarse a diferentes especies de insecto y se deben llevar a cabo comparaciones más pormenorizadas en cuanto a la acción de las ribotoxinas sobre diferentes tipos celulares para estar en disposición de hacer afirmaciones más rotundas en relación a la función biológica de las ribotoxinas.

Perspectivas de futuro en la investigación sobre ribotoxinas

Llegado este punto, conviene dedicar unas líneas a repasar las perspectivas abiertas en la investigación con ribotoxinas, algunas de las cuales se han ido mencionando a lo largo de esta discusión.

En primer lugar, el estudio de las relaciones estructura-función en la familia de las ribotoxinas plantea todavía muchas preguntas. El hecho de que la HtA englobe todas las características conocidas de estas proteínas en una estructura más pequeña resultará sin duda de gran ayuda en este sentido. En lo que se refiere al centro activo de las ribotoxinas, si bien este es bastante conocido, queda por confirmar si en la HtA un residuo de aspártico (Asp 40) puede tener implicación en la actividad de la proteína. En la α -sarcina, la mutación de la Tyr 48, que ocupa la posición equivalente a este residuo de la HtA, sustituyéndola por Phe da lugar a una variante inactiva frente a los ribosomas pero que retiene su capacidad de degradar ApA (Álvarez-García *et al.*, 2006). Estudios con mutantes que impliquen a este aspártico y otros residuos del centro activo de la HtA contribuirán sin duda a profundizar en los requerimientos necesarios para la especificidad de acción. Por otra parte, los estudios con los mutantes del centro activo de los que se trata en esta Tesis pueden ser completados hacia la caracterización de su actividad sobre sustratos inespecíficos, que tanta información han aportado sobre el modo de acción de las ribotoxinas.

Igualmente, aún quedan por aclarar muchos aspectos concernientes a la interacción de estas proteínas con lípidos y con su sustrato natural, el ribosoma. El mutante W65/71/78F de HtA ha abierto una sugerente vía de investigación en este doble sentido, al mantener actividad ribonucleolítica específica sobre ribosomas aislados pero resultar inactivo frente al SRL y no ser citotóxico. Mutantes individuales y dobles de estos residuos aportarán mucha información respecto a la implicación del bucle 3 en la interacción con membranas y con el entorno del SRL, pudiendo servir de herramientas para la exploración del ribosoma en la región que circunda el lazo sobre el que actúan las ribotoxinas. Estos mutantes también podrán arrojar luz sobre el papel de estos residuos

aromáticos en el mantenimiento de un entorno adecuado para la funcionalidad del centro activo, entorno que se revela más sutil con cada nuevo paso que se da hacia su pleno conocimiento. La comparación establecida entre los extremos aminoterminales de la HtA y la α -sarcina ha aportado valiosa información sobre la fundamental implicación de los residuos cargados positivamente de esta región, así como los del bucle 2, en los efectos observados sobre vesículas lipídicas. Mutantes de estos residuos, en el caso de la α -sarcina, y de los presentes en el bucle 5 de la hirsutelina ayudarán a profundizar en esta dirección. También puede resultar muy útil en este aspecto la homología descubierta entre ciertas regiones de la α -sarcina y el dominio C2 de la lactadherina. La posibilidad de generar quimeras de ambas proteínas para mejorar la especificidad de la toxicidad de las ribotoxinas tampoco es nada desdeñable. Con esta misma idea, la utilización del mutante activo pero no citotóxico W65/71/78F, o de otros más sencillos con idénticas propiedades, en la construcción de una inmunotoxina debe ser muy tenida en cuenta. El diseño de formas quiméricas de la RNasa T1 a las que se añadiera el extremo aminoterminal y/o el bucle 5 de la HtA podría resultar también de interés con el mismo fin, además de contribuir a un mejor conocimiento del papel exacto de ambos elementos de la estructura de la proteína estudiada en esta Memoria.

Para terminar, también queda abierta una nueva vía de exploración de la función biológica y especificidad de las ribotoxinas en cuanto a su acción sobre ribosomas de diferentes especies, en particular de insecto.

Por encima de todo ello, no se debe olvidar que las ribotoxinas constituyen una familia única en cuanto a la posibilidad que ofrecen de profundizar en el estudio sistemático de proteínas con actividad biológica, gracias a la ingente cantidad de conocimiento acumulado sobre ellas.

CONCLUSIONES

Se ha optimizado el crecimiento de cultivos del hongo *Hirsutella thompsonii*, así como la producción a partir de ellos de la hirsutelina (HtA). Se ha purificado esta proteína con una pureza de al menos el 99% y un rendimiento de 10mg por litro de cultivo.

Se ha clonado el cDNA de la HtA en el plásmido pTacTac y se ha conseguido la expresión y purificación de la proteína recombinante hasta obtenerla pura a homogeneidad, con un rendimiento de 0'25mg por litro de cultivo.

La caracterización exhaustiva de las proteínas purificadas, tanto a nivel estructural como funcional, ha demostrado que las formas fúngica y recombinante de la HtA resultan indistinguibles en cuanto a conformación y actividad.

El estudio de la actividad ribonucleolítica de la HtA sobre distintos sustratos ha demostrado su acción específica tanto sobre ribosomas eucariotas como sobre oligonucleótidos sintéticos que mimetizan la secuencia y estructura del lazo sarcina/ricina (SRL), frente a los que exhibe el comportamiento propio de las ribotoxinas. Asimismo, se han obtenido los parámetros cinéticos de la actividad de la enzima sobre dinucleósidos fosfato (ApA y CpC).

Se ha estudiado la interacción de la HtA con vesículas lipídicas modelo, demostrándose que induce alteraciones en vesículas de fosfolípidos ácidos como ocurre de forma general con las ribotoxinas, pero con unos efectos que permiten intuir un comportamiento distinto para la HtA.

Ha quedado demostrado el efecto citotóxico de la HtA sobre células de rhabdomiosarcoma humano, frente a las que exhibe valores de IC₅₀ muy similares a los de la α -sarcina.

La comparación de los resultados obtenidos en la caracterización estructural y funcional de la proteína objeto de estudio con los de las ribotoxinas conocidas ha permitido concluir que la HtA debe ser considerada como un nuevo miembro de esta familia de proteínas, resultando ser la ribotoxina de menor tamaño descrita hasta la fecha.

Se han diseñado, expresado y purificado los mutantes de HtA H42Q, E66Q y H113Q, así como los correspondientes mutantes dobles y triple en todas sus combinaciones posibles, y el mutante triple de triptófanos W65/71/78F. Se ha comprobado mediante medidas de dicroísmo circular que las diferentes variantes obtenidas conservan la conformación global de la proteína sin mutar.

Ensayos de actividad sobre diferentes sustratos y células han demostrado la implicación de los residuos H42, E66 y H113 en el centro activo de la HtA. Además, la variante W65/71/78F ha resultado ser el primer mutante no citotóxico de una ribotoxina que conserva su actividad específica sobre ribosomas aislados, aunque no es capaz de hacerlo sobre el oligo SRL, poniendo de manifiesto la participación de una zona hidrofóbica en la etapa de internación de la HtA en la célula.

Por último, se han comparado los efectos de HtA y α -sarcina sobre las líneas celulares de insecto High Five (*Trichoplusia ni*) y Sf9 (*Spodoptera frugiperda*), resultando ambas proteínas igualmente citotóxicas frente a estas células, lo que abre una nueva vía de exploración de la función biológica de las ribotoxinas.

REFERENCIAS

- Adel-Patient, K.; Ah-Leung, S.; Creminon, C.; Nouaille, S.; Chatel, J.M.; Langella, P.; Wal, J.M. (2005). "Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing bovine β -lactoglobulin partially prevents mice from sensitization". *Clin. Exp. Allergy* **35**: 539-546.
- Álvarez-García, E.; García-Ortega, L.; Verdún, Y.; Bruix, M.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J. G. (2006). "Tyr-48, a conserved residue in ribotoxins, is involved in the RNA-degrading activity of α -sarcin". *Biol. Chem.* **387**: 535-541.
- Álvarez-García, E.; Alegre-Cebollada, J.; Batanero, E.; Monedero, V.; Pérez-Martínez, G.; García-Fernández, R.; Gavilanes, J.G.; Martínez del Pozo, A. (2008). "*Lactococcus lactis* as a vehicle for the heterologous expression of fungal ribotoxin variants with reduced IgE-binding affinity". *J. Biotechnol.* **134**: 1-8.
- Aravind, L.; Koonin, E.V. (2001). "A natural classification of ribonucleases". *Meth. Enzymol.* **341**: 3-28.
- Arima, T.; Uchida, T.; Egami, F. (1968a). "Studies on extracellular ribonucleases of *Ustilago sphaerogena*. Purification and properties". *Biochem. J.* **106**: 601-607.
- Arima, T.; Uchida, T.; Egami, F. (1968b). "Studies on extracellular ribonucleases of *Ustilago sphaerogena*. Characterization of substrate specificity with special reference to purine-specific ribonucleases". *Biochem. J.* **106**: 609-613.
- Arni, R.K.; Watanabe, L.; Ward, R.J.; Kreitman, R.J.; Kumar, K.; Walz, F.G., Jr. (1999). "Three-dimensional structure of ribonuclease T1 complexed with and isosteric phosphonate substrate analogue of GpU: alternate substrate binding modes and catalysis". *Biochemistry* **38**: 2452-2461.
- Arruda, L.K.; Platts-Mills, T.A.; Fox, J.W.; Chapman, M.D. (1990). "*Aspergillus fumigatus* allergen I, a major IgE-binding protein, is a member of the mitogillin family of cytotoxins". *J. Exp. Med.* **172**: 1529-1532.
- Arruda, L.K.; Mann, B.J.; Chapman, M.D. (1992). "Selective expression of a major allergen and cytotoxin, Asp f 1, in *Aspergillus fumigatus*. Implications for the immunopathogenesis of *Aspergillus*-related diseases". *J. Immunol.* **149**: 3354-3359.
- Baker, J.R.; Neunzig, H.H. (1968). "*Hirsutella thompsonii* as a fungus parasite of the blueberry bud mite". *J. Econ. Entomol.* **61**: 1117-1118.
- Barlett, G.R. (1959). "Colorimetric assay methods for free and phosphorylated glyceric acids". *J. Biol. Chem.* **234**: 466-468.
- Bax, A.; Davis, D.G. (1985). "MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy". *J. Magn. Reson.* **65**: 355-360.
- Becktel, W.J.; Schellman, J.A. (1987). "Protein stability curves". *Biopolymers* **26**: 1859-1877.
- Beintema, J.J.; Breukelman, H.J.; Carsana, A.; Furia, A. (1997). "Evolution of vertebrate ribonucleases: Ribonuclease A superfamily". En: *Ribonucleases*. G.R. D'Alessio y J.F. Riordan, eds. (San Diego, CA, Estados Unidos: Academic Press), pp. 245-269.
- Benner, S.A.; Ciglic, M.I.; Haugg, M.; Jermann, T.M.; Opitz, J.G.; Raillard-Yoon, S.-A.; Soucek, J.; Stackhouse, J.; Trabesinger-Rüf, N.; Trautwein, K.; Zankel, T.R. (1997). "Evolutionary reconstructions in the ribonuclease family". En: *Ribonucleases*. G.R. D'Alessio y J.F. Riordan, eds. (San Diego, CA, Estados Unidos: Academic Press). pp. 213-243.

- Bergelson, L.D.; Dyatlovitskaya, E.V.; Torkhovskaya, T.I.; Sorokina, I.B.; Gorkova, N.P. (1970). "Phospholipid composition of membranes in the tumor cell". *Biochim. Biophys. Acta* **210**: 287-298.
- Better, M.; Bernhard, S.L.; Lei, S.P.; Fishwild, D.M.; Carroll, S.F. (1992). "Activity of recombinant mitogillin and mitogillin immunoconjugates". *J. Biol. Chem.* **267**: 16712-16718.
- Blank, A.; Dekker, C.A. (1975). "Differential activity staining: its use in characterization of guanylyl-specific ribonuclease in the genus *Ustilago*". *Proc. Natl. Acad. USA* **72**: 4914-4917.
- Blank, A.; Sugiyama, R.H.; Dekker, C.A. (1982). "Activity staining of nucleolytic enzymes after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: use of aqueous isopropanol to remove detergent from gels". *Anal. Biochem.* **120**: 267-275.
- Boucias, D.G.; Farmerie, W.G.; Pendland, J.C. (1998). "Cloning and sequencing of cDNA of the insecticidal toxin Hirsutellin A". *J. Invertebr. Pathol.* **72**: 258-261.
- Brandhorst, T.; Kenealy, W.R. (1992). "Production and localization of restrictocin in *Aspergillus restrictus*". *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1429-1435.
- Brandhorst, T.; Dowd, P.F.; Kenealy, W.R. (1996). "The ribosome-inactivating protein restrictocin deters insect feeding on *Aspergillus restrictus*". *Microbiology* **142**: 1551-1556.
- Bravo, J.; Fernández, E.; Ribó, M.; De Llorens, R.; Cuchillo, C.M. (1994). "A versatile negative-staining ribonuclease zymogram". *Anal. Biochem.* **219**: 82-86.
- Brigotti, M.; Rambelli, F.; Zamboni, M.; Montanaro, L.; Sperti, S. (1989). "Effect of α -sarcin and ribosome-inactivating proteins on the interaction of elongation factors with ribosomes". *Biochem. J.* **257**: 723-727.
- Burditt, A.K.; Reed, D.K.; Crittenden, C.R. (1962). "Observations on the mites *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) and *Aculus pelekassi* Keifer under laboratory conditions". *Florida Entomol. Soc.* **46**: 1-5.
- Campos-Olivas, R.; Bruix, M.; Santoro, J.; Martínez del Pozo, A.; Lacadena, J.; Gavilanes, J.G.; Rico, M. (1996). "H-1 and N-15 nuclear magnetic resonance assignment and secondary structure of the cytotoxic ribonuclease α -sarcin". *Protein Sci.* **5**: 969-972.
- Carreras-Sangrà, N.; Álvarez-García, E.; Herrero-Galán, E.; Tomé, J.; Lacadena, J.; Alegre-Cebollada, J.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G.; Martínez del Pozo, A. (2008). "The therapeutic potential of fungal ribotoxins". *Curr. Pharm. Biotechnol.* **9**: (en prensa).
- Chou, P.Y.; Fasman, G.D. (1978) "Empirical predictions of protein conformation". *Annu. Rev. Biochem.* **47**: 231-276.
- Ciglic, M.I.; Jackson, P.J.; Raillard, S.A.; Haugg, M.; Jermann, T.M.; Opitz, J.G.; Trabesinger-Rüf, N.; Benner, S.A. (1998). "Origin of dimeric structure in the ribonuclease superfamily". *Biochemistry* **37**: 4008-4022.
- Conde, F.P.; Orlandi, R.; Canevari, S.; Mezzanzanica, D.; Ripamonti, M.; Muñoz, S.M.; Jorge, P.; Colnaghi, M.I. (1989). "The *Aspergillus* toxin restriction is a suitable cytotoxic agent for generation of immunoconjugates with monoclonal

- antibodies directed against human carcinoma cells". *Eur. J. Biochem.* **178**: 795-802.
- Cook, S.P.; Galve-Roperh, I.; Martínez del Pozo, A.; Rodríguez-Crespo, I. (2002). "Direct calcium binding results in activation of brain serine racemase". *J. Biol. Chem.* **277**, 27782-27792.
- Correll, C.C.; Munishkin, A.; Chan, Y.L.; Ren, Z.; Wool, I.G.; Steitz, T.A. (1998). "Crystal structure of the ribosomal RNA domain essential for binding elongation factors". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95**: 13436-13441.
- Cramer, R.; Hemmann, S.; Ismail, C.; Menz, G.; Blaser, K. (1998). "Disease-specific recombinant allergens for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis". *Int. Immunol.* **10**: 1211-1216.
- D'Alessio, G.; Di Donato, A.; Parente, A.; Piccoli, R. (1991). "Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease superfamily". *Trends Biochem. Sci.* **16**: 104-106.
- De Antonio, C.; Martínez del Pozo, A.; Mancheño, J. M.; Oñaderra, M.; Lacadena, J.; Martínez-Ruiz, A.; Pérez-Cañadillas, J.M.; Bruix, M.; Gavilanes, J.G. (2000). "Assignment of the contribution of the tryptophan residues to the spectroscopic and functional properties of the ribotoxin α -sarcin". *Proteins* **41**: 350-361.
- De los Ríos, V. (1999). "Caracterización y mecanismo de acción de la sticholisina II". Tesis Doctoral. Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I, Madrid, Universidad Complutense.
- Deshpande, R.A.; Shankar, V. (2002). "Ribonucleases from T2 family". *Crit. Rev. Microbiol.* **28**: 79-122.
- Di Donato, A.; Cafaro, V.; D'Alessio, G. (1994). "Ribonuclease A can be transformed into a dimeric ribonuclease with antitumor activity". *J. Biol. Chem.* **269**: 17394-17396.
- Eftink, M.R.; Ghiron, C.A. (1976). "Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies". *Biochemistry* **15**: 672-680.
- Egami, F.; Oshima, T.; Uchida, T. (1980). "Specific interaction of base-specific nucleases with nucleosides and nucleotides" En: *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*. F. Chapeville y A.-L. Haenni, eds. (Berlín, Alemania: Springer-Verlag), pp. 250-277.
- Ehrlich, P. (1956). "The relationship between chemical constitution, distribution and pharmacological action". En: *The collected papers of Paul Ehrlich* Vol. 1. F. Himmelweit, M. Marquardt y H. Dale, eds. (Nueva York, Estados Unidos: Pergamon Press), pp. 596.
- Ellens, H.; Bentz, J.; Szoka, F.C. (1985). " H^+ and Ca^{2+} induced fusion and destabilization of liposomes". *Biochemistry* **24**: 3099-3106.
- Ellman, G.L. (1959). "Tissue sulfhydryl groups". *Arch. Biochem. Biophys.* **82**: 70-77.
- Endo, Y.; Wool, I.G. (1982). "The site of action of α -sarcin on eukaryotic ribosomes. The sequence at the α -sarcin cleavage site in 28S ribosomal ribonucleic acid". *J. Biol. Chem.* **257**: 9054-9060.
- Endo, Y.; Huber, P.W.; Wool, I.G. (1983). "The ribonuclease activity of the cytotoxin α -sarcin. The characteristics of the enzymatic activity of α -sarcin with ribosomes and ribonucleic acids as substrates". *J. Biol. Chem.* **258**: 2662-2667.

- Endo, Y.; Chan, Y.-L.; Lin, A.; Tsurugi, K.; Wool, I. (1988). "The cytotoxins α -sarcin and ricin retain their specificity when tested on a synthetic oligoribonucleotide (35-mer) that mimics a region of 28S ribosomal ribonucleic acid." *J. Biol. Chem.* **263**: 7917-7920.
- Engert, A.; Diehl, V.; Schnell, R.; Radszuhn, A.; Hatwig, M.T.; Drillich, S.; Schon, G.; Bohlen, H.; Tesch, H.; Hansmann, M.L.; Barth, S.; Schindler, J.; Ghetie, V.; Uhr, J.; Vitetta, E. (1997). "A phase-I study of an anti-CD25 ricin A-chain immunotoxin (RFT5-SMPT-dgA) in patients with refractory Hodgkin's lymphoma". *Blood* **89**: 403-410.
- Fando, J.L.; Alaba, I.; Escarmis, C.; Fernández-Luna, J.L.; Méndez, E.; Salinas, M. (1985). "The mode of action of restrictocin and mitogillin on eukaryotic ribosomes. Inhibition of brain protein synthesis, cleavage and sequence of the ribosomal RNA fragment". *Eur. J. Biochem.* **149**: 29-34.
- Fernández-Luna, J.L.; López-Otín, C.; Soriano, F.; Méndez, E. (1985). "Complete amino acid sequence of the *Aspergillus* cytotoxin mitogillin". *Biochemistry* **24**: 861-867.
- Filigheddu, N.; Cutrupi, S.; Porporato, P.E.; Riboni, F.; Baldanzi, G.; Chianale, F.; Fortina, E.; Piantanida, P.; De Bortoli, M.; Vacca, G.; Graziani, A.; Surico, N. (2007). "Diacylglycerol kinase is required for HGF-induced invasiveness and anchorage-independent growth of MDA-MB-231 breast cancer cells". *Anticancer Res.* **27**: 1489-1492.
- Fisher, F.E. (1950). "Two new species of *Hirsutella* Patouillard". *Mycologia* **42**: 290-97.
- Fisher, F.E.; Griffiths, J.T.; Thompson, W.L. (1949). "An epizootic of *Phyllocoptruta oleivora* (Ashm.) on citrus in Florida". *Phytopathology* **39**: 510-512.
- García-Mayoral, M.F.; Pérez-Cañadillas, J. M.; Santoro, J.; Ibarra-Molero, B.; Sánchez-Ruiz, J.M.; Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G.; Rico, M.; Bruix, M. (2003). "Dissecting structural and electrostatic interactions of charged groups in α -sarcin. An NMR study of some mutants involving the catalytic residues". *Biochemistry* **42**: 13122-13133.
- García-Mayoral, M.F.; García-Ortega, L.; Lillo, M.P.; Santoro, J.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G.; Rico, M.; Bruix, M. (2004). "NMR structure of the noncytotoxic α -sarcin mutant $\Delta(7-22)$: the importance of the native conformation of peripheral loops for activity". *Protein Sci.* **13**: 1000-1011.
- García-Mayoral, M.F.; Pantoja-Uceda, D.; Santoro, J.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G.; Rico, M.; Bruix, M. (2005a). "Refined NMR structure of α -sarcin by ^{15}N - ^1H residual dipolar couplings". *Eur. Biophys. J.* **34**: 1057-1065.
- García-Mayoral, M.F.; García-Ortega, L.; Álvarez-García, E.; Bruix, M.; Gavilanes, J.G.; Martínez del Pozo, A. (2005b). "Modeling the highly specific ribotoxin recognition of ribosomes". *FEBS Lett.* **579**: 6859-6864.
- García-Mayoral, M.F.; Martínez del Pozo, A.; Campos-Olivas, R.; Gavilanes, J.G.; Santoro, J.; Rico, M.; Laurents, D.V.; Bruix, M. (2006). "pH-dependent conformational stability of the ribotoxin α -sarcin and four active site charge substitution variants". *Biochemistry* **45**: 13705-13718.
- García-Ortega, L. (2004). "Papel de la horquilla amino-terminal como elemento clave en la funcionalidad de las ribotoxinas de *Aspergillus*". Tesis Doctoral. Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I, Madrid, Universidad Complutense.

- García-Ortega, L.; Lacadena, J.; Mancheño, J.M.; Oñaderra, M.; Kao, R.; Davies, J.; Olmo, N.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G. (2001). "Involvement of the amino-terminal β -hairpin of the *Aspergillus* ribotoxins on the interaction with membranes and nonspecific ribonuclease activity". *Protein Sci.* **10**: 1658-668.
- García-Ortega, L.; Masip, M.; Mancheño, J.M.; Oñaderra, M.; Lizarbe, M.A.; García-Mayoral, M.F.; Bruix, M.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G. (2002). "Deletion of the NH₂-terminal β -hairpin of the ribotoxin α -sarcin produces a nontoxic but active ribonuclease". *J. Biol. Chem.* **277**: 18632-18639.
- García-Ortega, L.; Lacadena, J.; Villalba, M.; Rodríguez, R.; Crespo, J.F.; Rodríguez, J.; Pascual, C.; Olmo, N.; Oñaderra, M.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G. (2005a). "Production and characterization of a noncytotoxic deletion variant of the *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 1 displaying reduced IgE binding". *FEBS J.* **272**: 2536-2544.
- García-Ortega, L.; De los Ríos, V.; Martínez-Ruiz, A.; Oñaderra, M.; Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G. (2005b). "Anomalous electrophoretic behavior of a very acidic protein: ribonuclease U2". *Electrophoresis* **26**: 3407-3413.
- Gasset, M.; Martínez del Pozo, A.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G. (1989). "Study of the interaction between the antitumour protein α -sarcin and phospholipid vesicles". *Biochem. J.* **258**: 569-575.
- Gasset, M.; Oñaderra, M.; Thomas, P.G.; Gavilanes, J.G. (1990). "Fusion of phospholipid vesicles produced by the anti-tumour protein α -sarcin". *Biochem. J.* **265**: 815-822.
- Gasset, M.; Oñaderra, M.; Martínez del Pozo, A.; Schiavo, G.-P.; Laynez, J.; Usobiaga, P.; Gavilanes, J.G. (1991a). "Effect of the antitumour protein α -sarcin on the thermotropic behaviour of acid phospholipid vesicles". *Biochim. Biophys. Acta* **1068**: 9-16.
- Gasset, M.; Oñaderra, M.; Goormaghtigh, E.; Gavilanes, J.G. (1991b). "Acid phospholipid vesicles produce conformational changes on the antitumour protein α -sarcin". *Biochim. Biophys. Acta* **1080**: 51-58.
- Gasset, M.; Mancheño, J.M.; Lacadena, J.; Turnay, J.; Olmo, N.; Lizarbe, M.A.; Martínez del Pozo, A.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G. (1994). " α -Sarcin, a ribosome-inactivating protein that translocates across the membranes of phospholipid vesicles". *Curr. Topics Pept. Membr. Res.* **1**: 99-104.
- Gasset, M.; Mancheño, J.M.; Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G. (1995a). "Spectroscopic characterization of the alkylated α -sarcin cytotoxin: Analysis of the structural requirements for the protein-lipid bilayer hydrophobic interaction". *Biochim. Biophys. Acta* **1252**: 43-52.
- Gasset, M.; Mancheño, J.M.; Laynez, J.; Lacadena, J.; Fernández-Ballester, G.; Martínez del Pozo, A.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G. (1995b). "Thermal unfolding of the cytotoxin α -sarcin: Phospholipid binding induces destabilization of the protein structure". *Biochim. Biophys. Acta* **1252**: 126-134.
- Ghetie, V.; Swindell, E.; Uhr, J.W.; Vitetta, E.S. (1993). "Purification and properties of immunotoxins containing one vs. two deglycosylated ricin A chains". *J. Immunol. Methods* **166**: 117-122.

- Glitz, D.G.; Dekker, C.A. (1964a). "Studies on a ribonuclease from *Ustilago sphaerogena*. I. Purification and properties of the enzyme". *Biochemistry* **3**: 1391-1399.
- Glück, A.; Wool, I.G. (1996). "Determination of the 28S ribosomal RNA identity element (G4319) for α -sarcin and the relationship of recognition to the selection of the catalytic site". *J. Mol. Biol.* **256**: 838-848.
- Gohda, K.; Oka, K.; Tomita, K.; Hakoshima, T. (1994). "Crystal structure of RNase T1 complexed with the product nucleotide 3'-GMP. Structural evidence for direct interaction of histidine 40 and glutamic acid 58 with the 2'-hydroxyl group of the ribose". *J. Biol. Chem.* **269**: 17531-17536.
- Gopalan, V.; Altman, S. (2006). "Ribonuclease P: Structure and catalysis". En: *The RNA world*. R.F. Gesteland, T.R. Cech y J.F. Atkins, eds. (Nueva York, Estados Unidos: Cold Spring Harbor), sólo disponible en <http://rna.cshl.edu>.
- Griner, E.M.; Kazanietz, M.G. (2007). "Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer". *Nat. Rev. Cancer* **7**: 281-294.
- Gruzza, M.; Fons, M.; Ouriet, M.F.; Duval-Iflah, Y.; Ducluzeau, R. (1994). "Study of gene transfer *in vitro* and in the digestive tract of gnotobiotic mice from *Lactococcus lactis* strains to various strains belonging to human intestinal flora". *Microb. Releases* **2**: 183-189.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids". *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hebert, E.J.; Giletto, A.; Sevcik, J.; Urbanikova, L.; Wilson, K.S.; Dauter, Z.; Pace, C.N. (1998). "Contribution of a conserved asparagine to the conformational stability of ribonucleases Sa, Ba, and T1". *Biochemistry* **38**: 16192-16200.
- Heinemann, U.; Hahn, U. (1989). "Structural and functional studies of ribonuclease T1". En: *Protein-nucleic acid interaction*. W. Saenger y U. Heinemann, eds. (Londres, Reino Unido: Macmillan), pp. 111-141.
- Heinemann, U.; Saenger, W. (1982). "Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T1-2'-guanylic acid complex: an X-ray study". *Nature* **299**: 27-31.
- Hemmann, S.; Menz, G.; Ismail, C.; Blaser, K.; Cramer, R. (1999). "Skin test reactivity to two recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens in *A. fumigatus*-sensitized asthmatic subjects allows diagnostic separation of allergic bronchopulmonary aspergillosis from fungal sensitization". *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**: 601-607.
- Herrero-Galán, E.; Álvarez-García, E.; Carreras-Sangrà, N.; Lacadena, J.; Alegre-Cebollada, J.; Martínez del Pozo, A.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G. (2008a). "Fungal ribotoxins: structure, function and evolution". En: *Microbial toxins: current research and future trends*. T. Proft, ed. (Nueva Zelanda: Horizon Bioscience), en prensa.
- Herrero-Galán, E.; Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Boucias, D.G.; Olmo, N.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G. (2008b). "The insecticidal protein hirsutellin A from the mite fungal pathogen *Hirsutella thompsonii* is a ribotoxin". *Proteins* **72**: 217-228.
- Higuchi, R.; Krummel, B.; Saiki, R.K. (1988). "A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions". *Nucleic Acids Res.* **16**: 7351-7367.

- Ho, S.N.; Hunt, H.D.; Horton, R.M.; Pullen, J.K.; Pease, L.R. (1989). "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction". *Gene* **77**: 51-59.
- Hope, M.J.; Bally, M.B.; Webb, G.; Cullis, P.R. (1985). "Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential". *Biochim. Biophys. Acta* **812**: 55-65.
- Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. (1996). "VMD: visual molecular dynamics". *J. Mol. Graph.* **14**: 33-38, 27-28.
- Ilinskaya, O.N.; Dreyer, F.; Mitkevich, V.A.; Shaw, K.L.; Pace, C.N.; Makarov, A.A. (2002). "Changing the net charge from negative to positive makes ribonuclease Sa cytotoxic". *Protein Sci.* **11**: 2522-2525.
- James, T.Y.; Kauff, F.; Schoch, C.L. etc. (2006). "Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny". *Nature* **443**: 818-822.
- Jennings, J.C.; Olson, B.H.; Roga, V.; June, A.J.; Schuurmans, D.M. (1965). " α -Sarcin, a new antitumor agent. II. Fermentation and antitumor spectrum". *Appl. Microbiol.* **13**: 322-326.
- Kanaya, S.; Uchida, T. (1986). "Comparison of the primary structure of ribonuclease U2 isoforms". *Biochem. J.* **240**: 163-170.
- Kanga, L.H.; James, R.R.; Boucias, D.G. (2002). "*Hirsutella thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* as potential microbial control agents of *Varroa destructor*, a honey bee parasite". *J. Invertebr. Pathol.* **81**: 175-184.
- Kao, R.; Davies, J. (1995). "Fungal ribotoxins: A family of naturally engineered targeted toxins?" *Biochem. Cell Biol.* **73**: 1151-1159.
- Kao, R.; Davies, J. (1999). "Molecular dissection of mitogillin reveals that the fungal ribotoxins are a family of natural genetically engineered ribonucleases". *J. Biol. Chem.* **274**: 12576-12582.
- Kao, R.; Martínez-Ruiz, A.; Martínez del Pozo, A.; Cramer, R.; Davies, J. (2001). "Mitogillin and related fungal ribotoxins". *Meth. Enzymol.* **341**: 324-335.
- Ke, A.; Doudna, J.A. (2006). "Catalytic strategies of self-cleaving ribozymes: relics of an RNA world?". En: *The RNA world*. R.F. Gesteland, T.R. Cech y J.F. Atkins, eds. (Nueva York, Estados Unidos: Cold Spring Harbor), p. 768.
- Kirjavainen, P.V.; Apostolou, E.; Salminen, S.J.; Isolauri, E. (1999). "New aspects of probiotics: a novel approach in the management of food allergy". *Allergy* **54**: 909-915.
- Klijn, N.; Weerkamp, A.H.; de Vos, W.M. (1995). "Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract". *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2771-2774.
- Koike, T.; Uchida, T.; Egami, F. (1971). "Synthesis of adenylyl-(3',5')-nucleosides, adenylyl-(3',5')-guanosine 2',3'-cyclic phosphate, and oligoadenylic acids by ribonuclease U₂". *J. Biochem.* **69**: 111-117.
- Koradi, R.; Billeter, M.; Wüthrich, K. (1996). "MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures". *J. Mol. Graph.* **14**: 51-55, 29-32.
- Korennykh, A.V.; Piccirilli, J.A.; Correll, C.C. (2006). "The electrostatic character of the ribosomal surface enables extraordinarily rapid target location by ribotoxins". *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**: 436-443.

- Korennykh, A.V.; Correll, C.C.; Piccirilli, J.A. (2007). "Evidence for the importance of electrostatics in the function of two distinct families of ribosome inactivating toxins". *RNA* **13**: 1391-1396.
- Kumar, A.; Wagner, G.; Ernst, R.R.; Wüthrich, K. (1980). "Studies of J-connectives and selective ^1H - ^1H Overhauser effects in H_2O solutions of biological macromolecules by two-dimensional NMR experiments". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**: 1156-1163.
- Kunkel, T.A.; Roberts, J.D.; Zakour, R.A. (1987). "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection". *Meth. Enzymol.* **154**: 367-382.
- Kurup, V.P. (2003). "Fungal allergens". *Curr. Allergy Asthma Rep.* **3**: 416-423.
- Kurup, V.P.; Kumar, A.; Kenealy, W.R.; Greenberger, P.A. (1994). "*Aspergillus* ribotoxins react with IgE and IgG antibodies of patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis". *J. Lab. Clin. Med.* **123**: 749-756.
- Kurup, V.P.; Shen, H.D.; Vijay, H. (2002). "Immunobiology of fungal allergens". *Int. Arch. Allergy Immunol.* **129**: 181-188.
- Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Barbero, J.L.; Mancheño, J.M.; Gasset, M.; Oñaderra, M.; López-Otín, C.; Ortega, S.; García, J.; Gavilanes, J.G. (1994). "Overproduction and purification of biologically active native fungal α -sarcin in *Escherichia coli*". *Gene* **142**: 147-151.
- Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Lacadena, V.; Martínez-Ruiz, A.; Mancheño, J.M.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G. (1998). "The cytotoxin α -sarcin behaves as a cyclizing ribonuclease". *FEBS Lett.* **424**: 46-48.
- Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Martínez-Ruiz, A.; Perez-Cañadillas, J. M.; Bruix, M.; Mancheño, J.M.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G. (1999). "Role of histidine-50, glutamic acid-96, and histidine-137 in the ribonucleolytic mechanism of the ribotoxin α -sarcin". *Proteins* **37**: 474-484.
- Lacadena, J.; Carreras-Sangrà, N.; Oñaderra, M.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G. (2005). "Production and purification of an immunotoxin based on the ribotoxin α -sarcin". En: *7th International Meeting on Ribonucleases*. L. Urbániková, ed. (Bratislava, Stará Lesná, República de Eslovaquia: ASCO Art & Science), abstract number P10, pp. 65.
- Lacadena, J.; Álvarez-García, E.; Carreras-Sangrà, N.; Herrero-Galán, E.; Alegre-Cebollada, J.; García-Ortega, L.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G.; Martínez del Pozo, A. (2007). "Fungal ribotoxins: molecular dissection of a family of natural killers". *FEMS Microbiol. Rev.* **31**: 212-237.
- Lakowicz, J.R. (1983). En: *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Nueva York, Estados Unidos: Plenum Press), pp. 341-379.
- Lamy, B.; Moutaouakil, M.; Latge, J.P.; Davies, J. (1991). "Secretion of a potential virulence factor, a fungal ribonucleotoxin, during human aspergillosis infections". *Mol. Microbiol.* **5**: 1811-1815.
- Lamy, B.; Davies, J.; Schindler, D. (1992). "The *Aspergillus* ribonucleolytic toxins (ribotoxins)". *Targeted Diagn. Ther.* **7**: 237-258.
- Lehmann, K.A.; Bass, B.L. (2000). "Double-stranded RNA adenosine deaminases ADAR1 and ADAR2 have overlapping specificities". *Biochemistry* **39**: 12875-12884.

- Lehrer, S.S. (1971). "Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion". *Biochemistry* **10**: 3254-3263.
- Leland, P.A.; Raines, R.T. (2001). "Cancer chemotherapy: ribonucleases to the rescue". *Chem. Biol.* **8**: 405-413.
- Lemaitre, B.; Nicolas, E.; Michaut, L.; Reichhart, J.M.; Hoffmann, J.A. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults". *Cell* **86**: 973-983.
- Liu, J.-C.; Boucias, D.G.; Pendland, J.C.; Liu, W.-Z.; Maruniak, J. (1996). "The mode of action of hirsutellin A on eukaryotic cells." *J. Invertebr. Pathol.* **67**: 224-228.
- Liu, W.-Z.; Boucias, D.G.; McCoy, C.W. (1995). "Extraction and characterization of the insecticidal toxin hirsutellin A produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii*". *Exp. Mycol.* **19**: 254-262.
- López-Otín, C.; Barber, D.; Fernández-Luna, J.L.; Soriano, F.; Méndez, E. (1984). "The primary structure of the cytotoxin restrictocin". *Eur. J. Biochem.* **143**: 621-634.
- Loverix, S.; Steyaert, J. (2001). "Deciphering the mechanism of RNase T1". *Meth. Enzymol.* **341**: 305-323.
- Loverix, S.; Doumen, J.; Steyaert, J. (1997). "Additivity of protein-guanine interactions in ribonuclease T1". *J. Biol. Chem.* **272**: 9635-9639.
- Lutzoni, F.; Pagel, M.; Reeb, V. (2001). "Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors". *Nature* **411**: 937-940.
- Maassen, C.B. (1999). "A rapid and safe plasmid isolation method for efficient engineering of recombinant lactobacilli expressing immunogenic or tolerogenic epitopes for oral administration". *J. Immunol. Meth.* **223**: 131-136.
- Macbeth, M.R.; Wool, I.G. (1999a). "The phenotype of mutations of G2655 in the sarcin/ricin domain of 23S ribosomal RNA". *J. Mol. Biol.* **285**: 965-975.
- MacIntosh, G.C.; Bariola, P.A.; Newbigin, E.; Green, P.J. (2001). "Characterization of Rny1, the *Saccharomyces cerevisiae* member of the T2 RNase family of RNases: unexpected functions for ancient enzymes?" *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **98**: 1018-1023.
- Makarov, A.A.; Ilinskaya, O.N. (2003). "Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets". *FEBS Lett.* **540**: 15-20.
- Mancheño, J.M.; Gasset, M.; Lacadena, J.; Ramon, F.; Martínez del Pozo, A.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G. (1994a). "Kinetic study of the aggregation and lipid mixing produced by α -sarcin on phosphatidylglycerol and phosphatidylserine vesicles: Stopped-flow light scattering and fluorescence energy transfer measurements". *Biophys. J.* **67**: 1117-1125.
- Mancheño, J.M.; Gasset, M.; Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G. (1994b). "Molecular interactions involved in the passage of the cytotoxic protein α -sarcin across membranes". En: *Biological membranes: Structure, Biogenesis and Dynamics*. NATO ASI Series, J.A.F. Op de Kamp, ed. (Berlin, Germany: Springer Verlag), pp. 269-276.
- Mancheño, J.M.; Gasset, M.; Albar, J.P.; Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G. (1995a). "Membrane interaction of a β -structure-forming synthetic peptide comprising the 116-139th sequence region of the cytotoxic protein α -sarcin". *Biophys. J.* **68**: 2387-2395.

- Mancheño, J.M.; Gasset, M.; Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G. (1995b). "Predictive study of the conformation of the cytotoxic protein α -sarcin: A structural model to explain α -sarcin-membrane interaction". *J. Theor. Biol.* **172**: 259-267.
- Mancheño, J.M.; Oñaderra, M.; Gasset, M.; Martínez del Pozo, A.; Lacadena, J.; Gavilanes, J.G. (1998a). "Aggregation and lipid-mixing of dimyristoylphosphatidylserine vesicles induced by the cytotoxin α -sarcin". *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* **92**: 185-193.
- Mancheño, J.M.; Martínez del Pozo, A.; Albar, J.P.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G. (1998b). "A peptide of nine amino acid residues from α -sarcin cytotoxin is a membrane-perturbing structure". *J. Pept. Res.* **51**: 142-148.
- Martínez-Oyanedel, J.; Choe, H.W.; Heinemann, U.; Saenger, W. (1991). "Ribonuclease T1 with free recognition and catalytic site: crystal structure analysis at 1.5 Å resolution". *J. Mol. Biol.* **222**: 335-352.
- Martínez-Ruiz, A. (2000). "Estudio de las relaciones estructura-función en toxinas proteicas de *Aspergillus*: secreción y actividad ribonucleolítica". Tesis Doctoral. Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I. Madrid, Universidad Complutense.
- Martínez-Ruiz, A.; Kao, R.; Davies, J.; Martínez del Pozo, A. (1999a). "Ribotoxins are a more widespread group of proteins within the filamentous fungi than previously believed". *Toxicon* **37**(11): 1549-1563.
- Martínez-Ruiz, A.; Martínez del Pozo, A.; Lacadena, J.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G. (1999b). "Hirsutellin A displays significant homology to microbial extracellular ribonucleases". *J. Invertebr. Pathol.* **74**: 96-97.
- Martínez-Ruiz, A.; García-Ortega, L.; Kao, R.; Oñaderra, M.; Mancheño, J.M.; Davies, J.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G. (2000). "Ribonuclease U2: cloning, production in *Pichia pastoris* and affinity chromatography purification of the active recombinant protein". *FEMS Microbiol. Lett.* **189**: 165-169.
- Martínez-Ruiz, A.; García-Ortega, L.; Kao, R.; Lacadena, J.; Oñaderra, M.; Mancheño, J.M.; Davies, J.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G. (2001). "RNase U2 and α -sarcin: a study of relationships". *Meth. Enzymol.* **341**: 335-351.
- Martínez del Pozo, A.; Gasset, M.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G. (1988). "Conformational study of the antitumor protein α -sarcin". *Biochim. Biophys. Acta* **953**: 280-288.
- Masip, M.; Lacadena, J.; Mancheño, J.M.; Oñaderra, M.; Martínez-Ruiz, A.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G. (2001). "Arginine 121 is a crucial residue for the specific cytotoxic activity of the ribotoxin α -sarcin". *Eur. J. Biochem.* **268**: 6190-6196.
- Masip, M.; García-Ortega, L.; Olmo, N.; García-Mayoral, M.F.; Pérez-Cañadillas, J.M.; Bruix, M.; Oñaderra, M.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G. (2003). "Leucine 145 of the ribotoxin α -sarcin plays a key role for determining the specificity of the ribosome-inactivating activity of the protein". *Protein Sci.* **12**: 161-169.
- Matousek, J. (2001). "Ribonucleases and their antitumor activity". *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **129**: 175-191.

- Mauguen, Y.; Hartley, R.W.; Dodson, E.J.; Dodson, G.G.; Bricogne, G.; Chothia, C.; Jack, A. (1982). "Molecular structure of a new family of ribonucleases". *Nature* **297**: 162-164.
- Mayer, L.D.; Hope, M.J.; Cullis, P.R. (1986). "Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure". *Biochim. Biophys Acta* **858**: 161-168.
- Mazet, I.; Vey, A. (1995). "Hirsutellin A, a toxic protein produced *in vitro* by *Hirsutella thompsonii*". *Microbiology* **141**: 1343-1348.
- McCoy, C.W.; Couch, T.L. (1982). "Microbial control of the citrus rust mite with the mycoacaricide Mycar". *Fla. Entomol.* **65**: 116-126.
- McCoy, C.W.; Kanavel, R.F. (1969). "Isolation of *Hirsutella thompsonii* from the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*, and its cultivation on various synthetic media". *J. Invertebr. Pathol.* **14**: 386-390.
- McCoy, C.W.; Selhime, A.G. (1977). "The fungus pathogen, *Hirsutella thompsonii*, and its potential use for control of the citrus rust mite in Florida". *Proc. Int. Citrus Congr.*, Murcia, España. Vol. **II**: 521-27.
- Mérida, I.; Ávila-Flores, A.; Merino, E. (2008). "Diacylglycerol kinases: at the hub of cell signalling". *Biochem. J.* **409**: 1-18.
- Merola, M.; Martínez del Pozo, A.; Ueno, H.; Recsei, P.; Di Donato, A.; Manning, J.M.; Tanizawa, K.; Masu, Y.; Asano, S.; Tanaka, H.; Soda, K.; Ringe, D.; Petsko, G.A. (1989). "Site-directed mutagenesis of the cysteinyl residues and the active-site serine residue of bacterial D-amino acid transaminase". *Biochemistry* **28**: 505-509.
- Messing, J. (1983). "New M13 vectors for cloning". *Meth. Enzymol.* **101**: 20-78.
- Moser, M.; Cramer, R.; Menz, G.; Schneider, T.; Dudler, T.; Virchow, C.; Gmachl, M.; Blaser, K.; Suter, M. (1992). "Cloning and expression of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a (rAsp f I/a) with IgE binding and type I skin test activity". *J. Immunol.* **149**: 454-460.
- Muchmore, D.C.; McIntosh, L.P.; Russell, C.B.; Anderson, D.E.; Dahlquist, F.W. (1989). "Expression and nitrogen-15 labeling of proteins for proton and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance". *Meth. Enzymol.* **177**: 44-71.
- Muma, M.H.; Selhime, A.G.; Denmark, H.A. (1961). "An annotated list of predators and parasites associated with insects and mites on Florida citrus". *Florida Agric. Exp. Sta. Techn. Bull.* **634**: 1-39.
- Murata, M.; Takahashi, S.; Kagiwada, S.; Suzuki, A.; Ohnishi, S. (1992). "pH-dependent membrane fusion and vesiculation of phospholipid large unilamellar vesicles induced by amphiphilic anionic and cationic peptides". *Biochemistry* **31**: 1986-1992.
- Nielsen, K.; Boston, R.S. (2001). "Ribosome-inactivating proteins: A plant perspective". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 785-816.
- Nishikawa, S.; Morioka, H.; Kim, H.J.; Fuchimura, K.; Tanaka, T.; Uesugi, S.; Hakoshima, T.; Tomita, K.; Ohtsuka, E.; Ikehara, M. (1987). "Two histidine residues are essential for ribonuclease T1 activity as is the case for ribonuclease A". *Biochemistry* **26**: 8620-8624.
- Noda, N.; Noguchi, S.; Satow, Y. (1997). "Crystal structures of nucleic acid complexes of ribonuclease U2". *Nucleic Acids Symp. Ser.* **37**: 285-86.

- Noguchi, S.; Satow, Y.; Uchida, T.; Sasaki, C.; Matsuzaki, T. (1995). "Crystal structure of *Ustilago sphaerogena* ribonuclease U2 at 1.8 Å resolution". *Biochemistry* **34**: 15583-15591.
- Olmo, N.; Turnay, J.; González de Buitrago, G.; López de Silanes, I.; Gavilanes, J.G.; Lizarbe, M.A. (2001). "Cytotoxic mechanism of the ribotoxin α -sarcin. Induction of cell death via apoptosis". *Eur. J. Biochem.* **268**: 2113-2123.
- Olson, B.H.; Goerner, G.L. (1965). " α -Sarcin, a new antitumor agent. I. Isolation, purification, chemical composition, and the identity of a new amino acid". *Appl. Microbiol.* **13**: 314-321.
- Omoto, C.; McCoy, C.W. (1998). "Toxicity of purified fungal toxin hirsutellin A to the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora* (Ash.)". *J. Invertebr. Pathol.* **72**: 319-322.
- Oñaderra, M.; Mancheño, J.M.; Gasset, M.; Lacadena, J.; Schiavo, G.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G. (1993). "Translocation of α -sarcin across the lipid bilayer of asolectin vesicles". *Biochem. J.* **295**: 221-225.
- Opitz, J.G.; Ciglic, M.I.; Haugg, M.; Trautweinfriz, K.; Raillard, S.A.; Jermann, T.M.; Benner, S.A. (1998). "Origin of the catalytic activity of bovine seminal ribonuclease against double-stranded RNA". *Biochemistry* **37**: 4023-4033.
- Orlandi, R.; Canevari, S.; Conde, F.P.; Leoni, F.; Mezzanzanica, D.; Ripamonti, M.; Colnaghi, M.I. (1988). "Immunoconjugate generation between the ribosome inactivating protein restrictocin and an anti-human breast carcinoma MAB". *Cancer Immunol. Immunother.* **26**: 114-120.
- Orntoft, T.F.; Vestergaard, E.M. (1999). "Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer". *Electrophoresis* **20**: 362-371.
- Osterman, H.L.; Walz, F.G., Jr. (1978). "Subsites and catalytic mechanism of ribonuclease T₁: kinetic studies using GpA, GpC, GpG, and GpU as substrates". *Biochemistry* **17**: 4124-4130.
- Ozman, S.K.; Goolsby, J.A. (2005). "Biology and phenology of the eriophyid mite, *Floracarus perrepae*, on its native host in Australia, Old World climbing fern, *Lygodium microphyllum*". *Exp. Appl. Acarol.* **35**: 197-213.
- Pace, C.N.; Heinemann, U.; Hahn, U.; Saenger, W. (1991). "Ribonuclease T₁: Structure, function and stability". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**: 343-360.
- Parente, R.A.; Nir, S.; Szoka, F.C., Jr. (1990). "Mechanism of leakage of phospholipid vesicle contents induced by the peptide GALA". *Biochemistry* **29**: 8720-8728.
- Peng, C.Y.; Zhou, X.; Kaya, H.K. (2002). "Virulence and site of infection of the fungus *Hirsutella thompsonii* to the honey bee ectoparasitic mite, *Varroa destructor*". *J. Invertebr. Pathol.* **81**: 185-195.
- Pérez, C.A.; Eichwald, C.; Burrone, O.; Mendoza, D. (2005). "Rotavirus vp7 antigen produced by *Lactococcus lactis* induces neutralizing antibodies in mice". *J. Appl. Microbiol.* **99**: 1158-1164.
- Pérez-Cañadillas, J.M.; Santoro, J.; Campos-Olivas, R.; Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G.; Rico, M.; Bruix, M. (2000). "The highly refined solution structure of the cytotoxic ribonuclease α -sarcin reveals the structural requirements for substrate recognition and ribonucleolytic activity". *J. Mol. Biol.* **299**: 1061-1073.

- Pérez-Cañadillas, J.M.; Guenneugues, M.; Campos-Olivas, R.; Santoro, J.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G.; Rico, M.; Bruix, M. (2002). "Backbone dynamics of the cytotoxic ribonuclease α -sarcin by ^{15}N NMR relaxation methods". *J. Biomol. NMR* **24**: 301-316.
- Pérez-Cañadillas, J.M.; García-Mayoral, M.F.; Laurents, D.V.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J.G.; Rico, M.; Bruix, M. (2003). "Tautomeric state of α -sarcin histidines. N δ tautomers are a common feature in the active site of extracellular microbial ribonucleases". *FEBS Lett.* **534**: 197-201.
- Peumans, W.J.; Hao, Q.; Van Damme, E.J. (2001). "Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases?" *FASEB J.* **15**: 1493-1506.
- Pfeiffer, S.; Kariminejad, Y.; Ruterjans, H. (1997). "Limits of NMR structure determination using variable target function calculations: Ribonuclease T1, a case study". *J. Mol. Biol.* **266**: 400-423.
- Pouwels, P.H.; Leer, R.J.; Boersma, W.J. (1996). "The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens". *J. Biotechnol.* **44**: 183-192.
- Ran, S.; Downes, A.; Thorpe, P.E. (2002). "Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels". *Cancer Res.* **62**: 6132-6140.
- Rathore, D.; Batra, J.K. (1996). "Generation of active immunotoxins containing recombinant restrictocin". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**: 58-63.
- Rathore, D.; Batra, J.K. (1997a). "Construction, expression and characterization of chimaeric toxins containing the ribonucleolytic toxin restrictocin: intracellular mechanism of action". *Biochem. J.* **324**: 815-822.
- Rathore, D.; Batra, J.K. (1997b). "Cytotoxic activity of ribonucleolytic toxin restrictocin-based chimeric toxins targeted to epidermal growth factor receptor". *FEBS Lett.* **407**: 275-279.
- Rathore, D.; Nayak, S.K.; Batra, J.K. (1997). "Overproduction of fungal ribotoxin α -sarcin in *Escherichia coli*: Generation of an active immunotoxin". *Gene* **190**: 31-35.
- Robinson, K.; Chamberlain, L.M.; Schofield, K.M.; Wells, J.M.; Le Page, R.W. (1997). "Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*". *Nat. Biotechnol.* **15**: 653-657.
- Rodríguez, R.; López-Otín, C.; Barber, D.; Fernandez-Luna, J.L.; González, G.; Méndez, E. (1982). "Amino acid sequence homologies in α -sarcin, restrictocin and mitogillin". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**: 315-321.
- Roga, V.; Hedeman, L.P.; Olson, B.H. (1971). "Evaluation of mitogillin (NSC-69529) in the treatment of naturally occurring canine neoplasms". *Cancer Chemother. Rep.* **55**: 101-113.
- Rosas-Acevedo, J.L. (2003). "Actividad biológica de los exudados y filtrado crudo de *Hirsutella thompsonii* Fisher (cepa HtM120I) sobre *Tetranychus urticae* Koch y otros artrópodos". Tesis Doctoral. México, Universidad de Colima.
- Rosas-Acevedo, J.L.; Boucias, D.G.; Lezama, R.; Sims, K.; Pescador, A. (2003). "Exudate from sporulating cultures of *Hirsutella thompsonii* inhibit oviposition by the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*". *Exp. Appl. Acarol.* **29**: 213-225.

- Rosenberg, H.F.; Domachowske, J.B. (1999). "Eosinophils, ribonucleases and host defense: solving the puzzle". *Immunol. Res.* **20**: 261-274.
- Rossi-Zalaf, L.S.; Alves, S.B. (2006). "Susceptibility of *Brevipalpus phoenicis* to entomopathogenic fungi". *Exp. Appl. Acarol.* **40**: 37-47.
- Rushizky, G.W.; Mozejko, J.H.; Rogerson, D.J.J.; Sober, H. (1970). "Characterization of enzymatic specificity of a ribonuclease from *Ustilago sphaerogena*". *Biochemistry* **9**: 4966-4971.
- Sacco, G.; Drickamer, K.; Wool, I.G. (1983). "The primary structure of the cytotoxin α -sarcin". *J. Biol. Chem.* **258**: 5811-5818.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor (Nueva York, Estados Unidos).
- Samson, R.A.; McCoy, C.W.; O'Donnell, K.L. (1980). "Taxonomy of the acarine parasite *Hirsutella thompsonii*". *Mycologia* **72**: 359-377.
- Sánchez-Martínez, C.; Pérez-Martín, J. (2001). "Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*: similar inputs, different outputs". *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 214-221.
- Sandvig, K.; van Deurs, B. (2000). "Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives". *EMBO J.* **19**: 5943-5950.
- Sato, S.; Uchida, T. (1975a). "On the interaction of ribonuclease U2 and substrate analogues". *Biochim. Biophys. Acta* **383**: 168-177.
- Sato, S.; Uchida, T. (1975b). "Ethoxyformation of ribonuclease U2 from *Ustilago sphaerogena*". *J. Biochem.* **77**: 795-800.
- Schindler, D.G.; Davies, J.E. (1977). "Specific cleavage of ribosomal RNA caused by α -sarcin". *Nucleic Acids Res.* **4**: 1097-1110.
- Schnell, R.; Vitetta, E.; Schindler, J.; Barth, S.; Winkler, U.; Borchmann, P.; Hansmann, M.L.; Diehl, V.; Ghetie, V.; Engert, A. (1998). "Clinical trials with an anti-CD25 ricin A-chain experimental and immunotoxin (RFT5-SMPT-dgA) in Hodgkin's lymphoma". *Leuk. Lymphoma* **30**: 525-537.
- Seggerson, K.; Moore, P.B. (1998). "Structure and stability of variants of the sarcin-ricin loop of 28S rRNA: NMR studies of the prokaryotic SRL and a functional mutant". *RNA* **4**: 1203-1215.
- Sevcik, J.; Dodson, E.J.; Dodson, G.G. (1991). "Determination and restrained least-squares refinement of the structures of ribonuclease Sa and its complex with 3'-guanylic acid at 1.8 Å resolution". *Acta Crystallogr. B.* **47**: 240-253.
- Shapiro, A.L.; Viñuela, E.; Maizel, J.V., Jr. (1967). "Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**: 815-820.
- Shapiro, R.; Fett, J.W.; Strydom, D.J.; Vallee, B.L. (1986). "Isolation and characterization of a human colon carcinoma-secreted enzyme with pancreatic ribonuclease-like activity". *Biochemistry* **25**: 7255-7264.
- Shi, J.; Blundell, T.L.; Mizuguchi, K. (2001). "FUGUE: sequence-structure homology recognition using environment specific substitution tables and structure-dependent gap penalties". *J. Mol. Biol.* **310**: 243-257.
- Spears, A.T.; Yothers, W.W. (1924). "Is there an entomogenous fungus attacking the citrus rust mite in Florida?" *Science* **60**: 41-42.

- Steidler, L.; Hans, W.; Schotte, L.; Neirynck, S.; Obermeier, F.; Falk, W.; Fiers, W.; Remaut, E. (2000). "Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10". *Science* **289**:1352-1355.
- Steyaert, J. (1997). "A decade of protein engineering on ribonuclease T1. Atomic dissection of the enzyme-substrate interactions". *Eur. J. Biochem.* **241**: 1-11.
- Steyaert, J.; Wyns, L. (1993). "Functional interactions among the His40, Glu58 and His92 catalysts of ribonuclease T1 as studied by double and triple mutants". *J. Mol. Biol.* **229**: 770-781.
- Steyaert, J., Hallenga, K., Wyns, L., Stanssens, P. (1990). "Histidine 40 of ribonuclease T1 acts as base catalyst when the true catalytic base, glutamic acid 58, is replaced by alanine". *Biochemistry* **29**: 9064-9072.
- Steyaert, J.; Haikal, A.F.; Stanssens, P.; Wyns, L. (1992). "Dissection of the ribonuclease T1 subsite. The transesterification kinetics of Asn36Ala and Asn98Ala ribonuclease T1 for minimal dinucleoside phosphates". *Eur. J. Biochem.* **203**: 551-555.
- Szewczak, A.A.; Moore, P.B. (1995). "The sarcin/ricin loop, a modular RNA". *J. Mol. Biol.* **247**: 81-98.
- Szewczak, A.A.; Moore, P.B.; Chan, Y.L.; Wool, I.G. (1993). "The Conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **90**: 9581-9285.
- Takahashi, K.; Hashimoto, J. (1988). "The amino acid sequence of ribonuclease U1, a guanine-specific ribonuclease from the fungus *Ustilago sphaerogena*". *J. Biochem.* **103**: 313-320.
- Turnay, J.; Olmo, N.; Jimenez, A.; Lizarbe, M.A.; Gavilanes, J.G. (1993). "Kinetic study of the cytotoxic effect of α -sarcin, a ribosome inactivating protein from *Aspergillus giganteus*, on tumour cell lines: protein biosynthesis inhibition and cell binding". *Mol. Cell. Biochem.* **122**: 39-47.
- Uchida, T.; Egami, F. (1971). "Microbial ribonucleases with special reference to RNases T1, T2, N1, and U2". En: *The enzymes*. P. D. Boyer, ed. (Nueva York, Estados Unidos: Academic Press), pp. 205-250.
- Uchida, T.; Shibata, Y. (1981). "An affinity adsorbent, 5'-adenylate-aminohexyl-sepharose. I. Purification and properties of two forms of RNase U2". *J. Biochem.* **90**: 463-471.
- Uchida, T.; Arima, T.; Egami, F. (1970). "Specificity of RNase U2". *J. Biochem.* **97**: 91-102.
- Uchiumi, T.; Honma, S.; Endo, Y.; Hachimori, A. (2002). "Ribosomal proteins at the stalk region modulate functional rRNA structures in the GTPase center". *J. Biol. Chem.* **277**: 41401-41409.
- Vatzaki, E.H.; Allen, S.C.; Leonidas, D.D.; Trautwein-Fritz, K.; Stackhouse, J.; Benner, S.A.; Acharya, K.R. (1999). "Crystal structure of a hybrid between ribonuclease A and bovine seminal ribonuclease - the basic surface, at 2.0 Å resolution". *Eur. J. Biochem.* **260**: 176-182.
- Velázquez-Campoy, A.; Ohtaka, H.; Nezami, A.; Muzammil, S.; Freire, E. (2004). "Isothermal titration calorimetry". *Curr. Protoc. Cell Biol.* **17**: 17.8.1-17.8.24.
- Vey, A.; Quiot, J.M.; Mazet, I.; McCoy, C.W. (1993). "Toxicity and pathology of crude broth filtrate produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii* in shake culture". *J. Invertebr. Pathol.* **61**: 131-137.

- Wawrzynczak, E.J.; Henry, R.V.; Cumber, A.J.; Parnell, G.D.; Derbyshire, E.J.; Ulbrich, N. (1991). "Biochemical, cytotoxic and pharmacokinetic properties of an immunotoxin composed of a mouse monoclonal antibody Fib75 and the ribosome-inactivating protein α -sarcin from *Aspergillus giganteus*". *Eur. J. Biochem.* **196**: 203-209.
- Wirth, J.; Martínez del Pozo, A.; Mancheño, J.M.; Martínez-Ruiz, A.; Lacadena, J.; Oñaderra, M.; Gavilanes, J.G. (1997). "Sequence determination and molecular characterization of gigantin, a cytotoxic protein produced by the mould *Aspergillus giganteus* IFO 5818". *Arch. Biochem. Biophys.* **343**: 188-193.
- Wool, I.G. (1997). "Structure and mechanism of action of the cytotoxic ribonuclease α -sarcin". En: *Ribonucleases*. G.R. D'Alessio y J. F. Riordan, eds. (San Diego, CA, Estados Unidos: Academic Press), pp. 131-62.
- Wool, I.G.; Glück, A.; Endo, Y. (1992). "Ribotoxin recognition of ribosomal RNA and a proposal for the mechanism of translocation". *Trends Biochem. Sci.* **17**: 266-269.
- Wüthrich, K. (1986). *NMR of proteins and nucleic acids*. (Nueva York, Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.).
- Yang, X.; Moffat, K. (1996). "Insights into specificity of cleavage and mechanism of cell entry from the crystal structure of the highly specific *Aspergillus* ribotoxin, restrictocin". *Structure* **4**: 837-852.
- Yang, X.; Gerczei, T.; Glover, L.; Correll, C.C. (2001). "Crystal structures of restrictocin-inhibitor complexes with implications for RNA recognition and base flipping". *Nat. Struct. Biol.* **8**: 968-973.
- Yasuda, T.; Inoue, Y. (1982). "Studies of catalysis by ribonuclease U2. Steady-state kinetics for transphosphorylation of oligonucleotide and synthetic substrates". *Biochemistry* **21**: 364-369.
- Yeung, T.; Gilbert, G.E.; Shi, J.; Silvius, J.; Kapus, A.; Grinstein, S. (2008). "Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization". *Science* **319**: 210-213.
- Zegers, I.; Haikal, A.F.; Palmer, R.; Wyns, L. (1994). "Crystal structure of RNase T1 with 3'-guanylic acid and guanosine". *J. Biol. Chem.* **269**: 127-133.
- Zegers, I.; Loris, R.; Dehollander, G.; Haikal, A.F.; Poortmans, F.; Steyaert, J.; Wyns, L. (1998). "Hydrolysis of a slow cyclic thiophosphate substrate of RNase T1 analyzed by time-resolved crystallography". *Nat. Struct. Biol.* **5**: 280-283.

